



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PREVALÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. E DE *GIARDIA* SPP. EM CÃES DO
DISTRITO DE BRAGANÇA, PORTUGAL

SÍLVIA MARIA FERREIRA LEAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI
Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

ORIENTADOR
Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

CO-ORIENTADOR
Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2015

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PREVALÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. E DE *GIARDIA* SPP. EM CÃES DO
DISTRITO DE BRAGANÇA, PORTUGAL

SÍLVIA MARIA FERREIRA LEAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

ORIENTADOR

Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

CO-ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2015

LISBOA

À minha mãe.

“Todas as coisas da criação são filhos do Pai e irmãos do Homem... Deus quer que ajudemos aos animais, se necessitam de ajuda. Toda criatura em desgraça tem o mesmo direito a ser protegida.”

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por nunca terem deixado de acreditar.

Ao meu querido irmão, sem o qual nunca teria conseguido.

Ao meu orientador Professor Doutor José Meireles, por me ter dado a oportunidade de trabalhar este tema e por toda a disponibilidade e ajuda prestadas.

Ao meu coorientador Dr. Gonçalo Vicente, por me ter aceite como estagiária e por partilhar o seu trabalho de excelência, amizade e boa disposição.

Ao Professor Doutor Álvaro Mendonça e seus colaboradores, pela oportunidade de colaborar neste estudo e por todo o material disponibilizado.

À Dra. Lídia Gomes, por tudo o que me ensinou no laboratório, pelo seu bom humor característico e pela paciência nos meus momentos desastrosos.

Ao Professor Telmo Nunes, pela ajuda prestada no processamento estatístico dos dados.

Ao Dr. Godinho, Médico Veterinário no Canil Intermunicipal de Vimioso, e ao Dr. Jorge Santos, Médico Veterinário no Canil Intermunicipal da Terra Quente Transmontana, pelos esclarecimentos prestados.

A toda a equipa do hospital, pela amabilidade e respeito com que me receberam, por tudo o que me ensinaram.

Aos meus companheiros de estágio, pelo trabalho em equipa, convívio e amizade.

À Catarina, pela amizade.

À Juliana, a melhor companheira de viagens.

Aos meus amigos.

Ao Putchi e à Camila, os cães.

À Julieta, a gata.

APOIO FINANCEIRO

A presente dissertação surge da colaboração entre a FMV-UL e a Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. Os testes de imunofluorescência direta foram financiados pelo projeto 0441_ZOONOSIS_2_E 0461_BIOURB_2_E_E.

RESUMO

Prevalência de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. em cães do distrito de Bragança, Portugal

Os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. infetam vários hospedeiros, incluindo o Homem, e são considerados importantes parasitas dos animais domésticos; nestes, as infeções são geralmente assintomáticas ou autolimitantes. No cão, em estudos realizados em Portugal obtiveram-se prevalências de *Cryptosporidium* spp. entre 11% e 18% e de *Giardia* spp. entre 1,3% e 61%, dependendo de vários fatores como a origem do cão e o teste de diagnóstico escolhido.

Neste estudo, amostras fecais de 126 cães de várias origens do distrito de Bragança, idades, géneros e raças, foram analisadas por imunofluorescência direta (kit Crypto/Giardia Cel[®], Cellabs[®]) para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e quistos de *Giardia* spp. Das amostras fecais analisadas, 21,4% apresentaram pelo menos um protozoário. A prevalência de *Giardia* spp. na amostra populacional foi de 19,8%. Houve uma maior prevalência significativa ($p < 0,05$) de *Giardia* spp. nos canis intermunicipais (26,5%), no grupo etário adulto com menos de sete anos (26,7%) e no grupo cujas fezes apresentavam consistência semipastosa (42,9%). A prevalência de *Cryptosporidium* spp. na amostra populacional foi de 2,4% e não foram encontrados fatores de risco nem associação com sinais clínicos. A infeção por ambos os protozoários foi detetada em uma amostra.

Os resultados deste estudo demonstraram que os cães do distrito de Bragança são importantes reservatórios do protozoário *Giardia* spp., com potencial carácter zoonótico. A idade adulta e a proveniência de canis intermunicipais foram considerados fatores de risco para a infeção por *Giardia* spp.; a influência deste parasita sobre a consistência fecal parece ser discreta. A infeção por *Cryptosporidium* spp. em cães neste distrito não parece ser relevante, assim como a infeção simultânea por ambos os protozoários. Assim, estes cães podem representar um risco, relativamente ao género *Giardia*, para a equipa técnica dos canis intermunicipais e podem agir como fonte de contaminação de espaços públicos até ao momento da sua captura.

Palavras-chave: Cães, Imunofluorescência direta, *Cryptosporidium*, *Giardia*, Zoonoses, Bragança, Portugal

ABSTRACT

Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in dogs in Bragança district, Portugal

The protozoan parasites *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infect a large host range including humans and are considered important parasites in companion animals, in which infections are usually asymptomatic or self-limiting. From Portuguese studies, the prevalence of *Cryptosporidium* spp. is about 11% to 18% and the prevalence of *Giardia* spp. is about 1,3% to 61%, depending on several factors as dog origin and diagnostic test chosen.

In this study, fecal samples were collected from 126 dogs of different Bragança origin, age, gender and breed and analyzed via direct immunofluorescence assay (Crypto/Giardia Cel[®] kit, Cellabs[®]) for *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts.

Of 126 fecal samples, 21,4% showed at least one protozoan parasite. *Giardia* spp. cysts were present in 19.8% of fecal samples. There was significantly ($p<0,05$) greater prevalence of *Giardia* spp. in dogs from official kennel (26,5%), between one and seven years old (26,7%) and with half pasty fecal consistency. *Cryptosporidium* spp. oocysts were present in 2,4% of fecal samples and weren't found any risk factors or association to clinical signs. Both protozoan parasites were found in only one fecal sample.

The results of this study showed that dogs in Bragança district are important reservoirs for the zoonotic protozoan parasite *Giardia* spp. The adult age and source from official kennel were identified as risk factors for *Giardia* spp. infection; *Giardia* spp. influence on fecal consistency seems to be discreet. *Cryptosporidium* spp. infection in dogs in Bragança district doesn't seem to be relevant, so as the association between both protozoan parasites. Thus, these dogs can pose a risk, relative to the genus *Giardia*, to the technical team of official kennels and can act as a source of contamination to public spaces by the time of their capture.

Keywords: Dogs, Direct immunofluorescence assay, *Cryptosporidium*, *Giardia*, Zoonosis, Bragança, Portugal

DIVULGAÇÃO DE RESULTADOS DO PRESENTE ESTUDO À COMUNIDADE CIENTÍFICA

Os resultados expostos nesta dissertação foram apresentados no XVII Congresso Português de Parasitologia, que decorreu a 20 e 21 de Novembro de 2014, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugal:

- Leal, S., Vicente, G., Mendonça, A., Meireles, J. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. em cães do distrito de Bragança, Portugal. Comunicação em painel – 42 Livro de Resumos. Acta Parasitológica Portuguesa 2014, 20(1/2), 232-233 (ANEXOS I e II).

ÍNDICE

Índice geral	viii
Índice de figuras	x
Índice de tabelas.....	xi
Índice de gráficos.....	xi
Lista de símbolos e abreviaturas.....	xii
Capítulo I. Atividades desenvolvidas durante o estágio curricular	1
1. Estágio em clínica de animais de companhia	1
2. Estágio no Laboratório de Parasitologia e de Doenças Parasitárias.....	2
Capítulo II. Revisão Bibliográfica	3
1. Introdução	3
2. Nota histórica	3
3. Taxonomia	4
3.1. Espécies do género <i>Cryptosporidium</i>	5
3.1.1.Espécies do género <i>Cryptosporidium</i> no cão	6
3.2. Espécies do género <i>Giardia</i>	7
3.2.1.Espécies do género <i>Giardia</i> no cão	7
4. Biologia	8
4.1. Características morfológicas de <i>Cryptosporidium</i> spp.	8
4.1.1. Oocisto	8
4.1.2. Esporozoíto	9
4.1.3. Trofozoíto e merozoítos.....	10
4.2. Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	11
4.3. Características morfológicas de <i>G. duodenalis</i>	14
4.3.1. Quisto.....	14
4.3.2. Trofozoíto	15
4.4. Ciclo biológico de <i>G. duodenalis</i>	16
5. Epidemiologia.....	21
5.1. Prevalência	22
5.2. Importância zoonótica	23
6. Patogenia.....	25
6.1. Resposta imunitária a <i>Cryptosporidium</i> spp.	25
6.2. Resposta imunitária a <i>G. duodenalis</i>	26
7. Diagnóstico	27
7.1. Diagnóstico Clínico	27
7.2. Diagnóstico laboratorial e radiológico.....	28
7.2.1. Microscopia convencional.....	29
a) Esfregaço direto	29
b) Esfregaço fecal corado.....	29
c) Técnicas de concentração	30
7.2.2. Microscopia de fluorescência.....	31
7.2.3. Técnicas Imunológicas	31
a) Coproscopia por imunofluorescência.....	31
b) Pesquisa de coproantígenos.....	32
7.2.4. Técnicas moleculares: <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	33
8. Controlo da criptosporidiose	33
8.1. Terapêutica.....	33
8.2. Vacinação	35
8.3. Suplementos nutricionais	35
8.4. Medidas sanitárias e prevenção.....	35
9. Controlo da giardiose	36
9.1. Terapêutica.....	36
9.1.1. Alternativas terapêuticas	36
9.2. Vacinação.....	37
9.3. Suplementos nutricionais	37

9.4. Medidas sanitárias e prevenção.....	37
10. Prognóstico	38
Capítulo III. Estudo: Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. e de <i>Giardia</i> spp. em cães do distrito de Bragança, Portugal.....	39
1. Objetivos	39
2. Materiais e Métodos	39
2.1. Área de estudo	39
2.1.1. Canis de recolha oficial (CRO)	39
2.1.1.1. Canil Intermunicipal da Terra Quente Transmontana (CITQT).....	39
2.1.1.2. Canil Intermunicipal de Vimioso (CIV)	40
2.1.2. Canil de abrigo	40
2.1.2.1. Associação Brigantina de Proteção aos Animais (ABPA)	40
2.2. Amostragem e conservação	40
2.3. Métodos	41
2.3.1. Pesquisa de coproantígenos pela técnica de imunofluorescência indireta	41
2.3.2. Pesquisa de formas parasitárias pelas técnicas de flutuação pelo método de Willis e de sedimentação natural.....	44
2.4. Análise estatística	45
3. Resultados	45
3.1. Caracterização geral da amostra populacional.....	45
3.2. Avaliação macroscópica das fezes	47
3.3. Análises parasitológicas.....	48
3.3.1. Imunofluorescência direta	48
3.3.1.1. Prevalência global.....	48
3.3.1.2. Infecção por <i>Giardia</i> spp. e fatores de risco.....	49
3.3.1.3. Infecção por <i>Giardia</i> spp. e sinais clínicos	50
3.3.1.4. Infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. e fatores de risco.....	51
3.3.1.5. Infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. e sinais clínicos	52
3.3.2. Flutuação e sedimentação passivas	53
3.3.3. Coinfecções parasitárias.....	54
3.3.4. Influência da presença de helmintes	55
4. Discussão	56
4.1. Fatores de risco	58
4.2. Sinais clínicos	62
4.3. Coinfecções parasitárias.....	63
4.4. Infecção por helmintes.....	64
4.5. Importância zoonótica	65
5. Conclusão	66
Bibliografia.....	68
ANEXO I	80
ANEXO II	82
ANEXO III	83
ANEXO IV.....	85
ANEXO V.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pseudoparasitas observados com a técnica de flutuação. Fonte original.....	2
Figura 2. Oocistos de <i>C. parvum</i> (A) e pormenor em caixa dos quatro esporozoítos (B). Microscopia eletrónica de varrimento (MEV). Adaptado de Edwards, Thompson, Koh & Clode, 2012.	9
Figura 3. Representação esquemática do esporozoíto de <i>Cryptosporidium</i> spp. Adaptado Smith <i>et al.</i> , 2005.....	10
Figura 4. Trofozoíto no interior do vacúolo parasitóforo (A) e merozoíto aderido ao enterócito (B), <i>C. parvum</i> , microscopia eletrónica de transmissão (MET). Adaptado de Forney, Wald, Yang, Speer & Healey, 1999.....	11
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp. Adaptado de Bouzid, Hunter, Chalmers & Tyler, 2013.....	11
Figura 6. Desenquistamento de <i>Cryptosporidium</i> spp., MEV. Adaptado de Smith <i>et al.</i> , 2005.	12
Figura 7. Envolvimento do esporozoíto de <i>C. muris</i> por uma dobra membranar (seta) e formação do saco parasitóforo, MEV. Adaptado de Valigurová <i>et al.</i> , 2008.	12
Figura 8. Vacúolo parasitóforo em enterócito infetado por <i>Cryptosporidium</i> spp., MET. Adaptado de Elliott & Clark, 2000.	13
Figura 9. Quisto de <i>G. duodenalis</i> , MEV (A) e MET (B). Adaptado de Midlej & Benchimol, 2009.....	15
Figura 10. Trofozoíto de <i>G. duodenalis</i> , vista dorsal (A) e vista ventral (B), MEV. Adaptado de Midlej & Benchimol, 2009.....	16
Figura 11. Trofozoíto de <i>G. duodenalis</i> , microscopia ótica. A seta indica o corpo mediano. Adaptado de Piva & Benchimol, 2004.	16
Figura 12. Ciclo de vida de <i>G. duodenalis</i> . Adaptado de BayOPet, 2011.....	17
Figura 13: Adesão do trofozoíto a um substrato inerte, microscopia de reflexão interna total (em cima) e respetivas projeções de intensidade a duas dimensões (em baixo). Adaptado de House <i>et al.</i> , 2011.....	18
Figura 14. Replicação nuclear em representação esquemática a três dimensões (A) e por imunofluorescência indireta, vista dorsoventral (B). Os asteriscos indicam os núcleos dorsocaudais. Adaptado de Sagolla <i>et al.</i> , 2006.	18
Figura 15. Citocinese de trofozoíto de <i>G. duodenalis</i> . Divisões ventral-ventral (em cima), dorsal-dorsal (ao meio) e ventral-dorsal (em baixo), MEV. Adaptado de Benchimol, 2004. .	19
Figura 16. Enquistamento de trofozoíto de <i>G. duodenalis</i> , MEV. Adaptado de Midlej & Benchimol, 2009.	20
Figura 17. Quistos imaturos de <i>G. duodenalis</i> (setas), imunofluorescência direta 400x. Fonte original.	21
Figura 18. Ciclos de transmissão de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>G. duodenalis</i> . Adaptado de Hunter & Thompson, 2005.	22
Figura 19. Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. (seta a laranja) e quistos de <i>Giardia</i> spp. (seta a azul) em lâmina de controlo positivo, 400x. Fonte original.	42
Figura 20. Teste Crypto/Giardia Cel [®] (A) e lâminas de imunofluorescência (B). Fonte original.	42
Figura 21. Execução da técnica de IFD com o teste Crypto/Giardia Cel [®] . Fonte original.	43
Figura 22. Flutuação pelo método de Willis (A) e sedimento após rejeição do sobrenadante (B). Fonte original.	44
Figura 23. Adulto de <i>Toxocara canis</i> em álcool etílico a 70% (A) e observação à lupa da extremidade anterior (B) e posterior (C). Fonte original.....	48
Figura 24. Amostras submetidas a imunofluorescência direta e positivas a <i>Giardia</i> spp. (A) e a <i>Cryptosporidium</i> spp. (B), 440x. Fonte original.....	48
Figura 25. Exemplares dos ovos encontrados pelas técnicas de flutuação (A-E, fonte original) e sedimentação (F, fonte original cedida por Dra. Lídia Gomes).	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Giardia</i> spp. e seus hospedeiros. Adaptado de Monis, Caccio & Thompson, 2009.....	7
Tabela 2. <i>Assemblages</i> de <i>G. duodenalis</i> e seus hospedeiros. Adaptado de Lasek-Nesselquist <i>et al.</i> , 2010; Monis <i>et al.</i> , 2009.....	7
Tabela 3. Dimensões dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. das espécies identificadas no cão. Fonte: Chalmers & Katzer, 2013; ESCCAP, 2011.....	9
Tabela 4. Escala de classificação da consistência fecal.	41
Tabela 5. Distribuição dos cães consoante a raça (n= 121).....	46
Tabela 6. Distribuição dos cães consoante o grupo etário e a origem (n=115).	47
Tabela 7. Prevalências de <i>Cryptosporidium</i> spp., de <i>Giardia</i> spp. e do total na amostra populacional submetida a imunofluorescência direta (n=126).....	49
Tabela 8. Efeito da origem, da raça, do grupo etário e do gênero na prevalência de <i>Giardia</i> spp.....	49
Tabela 9. Prevalência de <i>Giardia</i> spp. consoante a condição corporal (n=121) e a consistência fecal (n=126).	50
Tabela 10. Distribuição das amostras positivas a <i>Giardia</i> spp. consoante o grupo etário e a consistência fecal.	51
Tabela 11. Efeito da origem, da raça, do grupo etário e do gênero na prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp.	51
Tabela 12. Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. consoante a condição corporal (n=121) e a consistência fecal (n=126).	52
Tabela 13. Prevalências dos parasitas intestinais encontrados na amostra populacional submetida a flutuação e a sedimentação (n=125).....	54
Tabela 14. Prevalência dos parasitas obtidos por flutuação e sedimentação consoante a condição corporal (n=120) e a consistência fecal (n=125).	54
Tabela 15. Frequência absoluta e prevalência das coinfeções parasitárias na amostra populacional (n=125).	55

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Número de horas dedicadas a cada área da clínica de animais de companhia.	1
Gráfico 2. Distribuição dos cães consoante a origem (n= 121).	45
Gráfico 3. Distribuição dos cães consoante o gênero (n= 121).	46
Gráfico 4. Distribuição dos cães por grupo etário (n= 115).	47
Gráfico 5. Distribuição das amostras fecais consoante a consistência (n=126).	47
Gráfico 6. Distribuição das amostras consoante a ausência ou presença de parasitas e o tipo de infecção encontrada (n=125).	55
Gráfico 7. Distribuição das amostras em função da presença e ausência de protozoários e de helmintos (n=125).	56

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABPA	Associação Brigantina de Apoio aos Animais
Ac	anticorpos
Acm	anticorpos monoclonais
ADN	ácido desoxirribonucleico
<i>bg</i>	β -giardina
BID	<i>bis in die</i> (duas vezes ao dia)
C.	<i>Cryptosporidium</i>
CITQT	Canil Intermunicipal da Terra Quente Transmontana
CIV	Canil Intermunicipal de Vimioso
CONTROL+	lâmina de controlo positivo
COWP	<i>Cryptosporidium oocyst wall protein</i>
CRO	Centro de Recolha Oficial
CSL	proteína <i>circumsporozoite-like</i>
CWP	<i>cyst wall protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESCCAP	<i>European Scientific Counsel Companion Animal Parasites</i>
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
G.	<i>Giardia</i>
<i>gdh</i>	glutamato desidrogenase
<i>hsp 70</i>	proteína de choque térmico de 70 quilodalton
IC	imunocromatografia
IC 95%	intervalo de confiança de 95 por cento
ICZN	<i>International Code of Zoological Nomenclature</i>
IFD	imunofluorescência direta
Ig	imunoglobulina
KDa	quilodalton
MET	microscopia eletrónica de transmissão
MEV	microscopia eletrónica de varrimento
mg/Kg	miligramas por quilograma
ml	mililitro
mm	milímetros
<i>p</i>	nível de significância
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PO	<i>per os</i> (por via oral)
RGM	meio de montagem

rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
RR2	reagente Crypto/Giardia Cel
SAF	acetato de sódio - ácido acético - formalina
SID	<i>semel in die</i> (uma vez ao dia)
SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
spp.	espécies
ssu-rRNA	subunidade do ácido ribonucleico ribossomal
TID	<i>ter in die</i> (três vezes ao dia)
<i>tpi</i>	isomerase triose fosfato
ULisboa	Universidade de Lisboa
VSP	<i>variant-specific surface protein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
µl	microlitros
µm	micrómetros
χ^2	teste Qui-quadrado de Pearson
%	percentagem
°C	graus Celsius
(?)	frequência de transmissão desconhecida
18S-rRNA	subunidade do ácido ribonucleico ribossomal nuclear

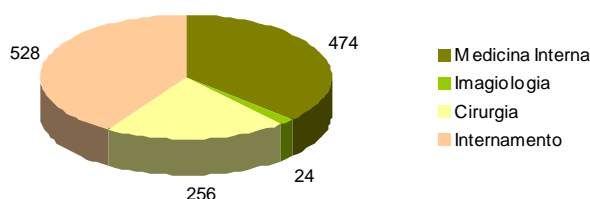
CAPÍTULO I. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

1. Estágio em clínica de animais de companhia

A primeira fase do estágio curricular decorreu no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa), durante o período de Março a Agosto de 2013.

O estágio decorreu de forma rotativa entre as diversas áreas que o Hospital oferece: Medicina Interna, Imagiologia, Cirurgia e Internamento (Gráfico 1). Na Medicina Interna, as principais espécies assistidas foram a canina e a felina; foi, também, possível assistir a algumas consultas de novos animais de companhia, nomeadamente de lagomorfos e de roedores. As atividades desenvolvidas nas consultas consistiram no auxílio na realização da anamnese, do exame físico, da recolha de materiais biológicos, da administração de fármacos ou de vacinas, da triagem aos paciente urgentes e da hospitalização. O papel ativo dos estudantes e estagiários neste hospital proporciona uma ferramenta essencial na aprendizagem à comunicação com os proprietários. Na área da cirurgia destacam-se o auxílio na realização da cirurgia, dos procedimentos anestésicos e analgésicos, da preparação do animal para a cirurgia e da monitorização pré, durante e pós anestésica. As técnicas de diagnóstico por imagem incluíram a radiologia, a tomografia computadorizada e a ecografia; nesta área é de salientar o auxílio na contenção dos animais durante a realização das mesmas, o auxílio na realização dos procedimentos sedativos e anestésicos e na interpretação dos resultados. O internamento foi a área à qual mais horas foram dedicadas e a que permitiu a execução, de forma mais serena, dos procedimentos médicos; estes incluíram: colocação de cateteres, recolha de materiais biológicos, administração de fármacos, algaliações e transfusões sanguíneas. Esta área exigiu ainda a monitorização dos pacientes internados e a prestação dos cuidados de alimentação e higiene aos mesmos. Por último, foi oportuno acompanhar uma saída à Fundação São Francisco de Assis para recolha de sangue de cão e de gato para o Banco de Sangue Veterinário do hospital.

Gráfico 1. Número de horas dedicadas a cada área da clínica de animais de companhia.



2. Estágio no Laboratório de Parasitologia e de Doenças Parasitárias

O estágio no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV decorreu de Março a Junho de 2014. Durante este período foram efetuadas as técnicas de imunofluorescência direta, flutuação de Willis e sedimentação natural. Durante a execução das mesmas, foi possível visualizar algumas estruturas curiosas (Figura 1), sem interesse para o estudo. Foi possível, ainda, assistir à realização de algumas técnicas parasitológicas que não estão incluídas neste estudo, como o esfregaço de Ziehl-Neelsen ou a técnica de Baermann.

Figura 1. Pseudoparasitas observados com a técnica de flutuação. Fonte original.



CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Introdução

O cão é considerado, cada vez mais, um membro da família; se por um lado está associado ao bem-estar psicológico e fisiológico do Homem, por outro pode representar riscos para a saúde pública; entre estes inserem-se os parasitas com potencial zoonótico, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (Overgaauw *et al.*, 2009).

Os parasitas em causa são protozoários com distribuição mundial capazes de infetar uma grande diversidade de hospedeiros, incluindo o Homem e os animais domésticos (Thompson, Palmer, & O'Handley, 2008). As suas prevalências tendem a ser mais elevadas em ambientes de maior densidade animal, como os canis, e geralmente são infeções que se mantêm assintomáticas, não sendo detetadas (*European Scientific Counsel Companion Animal Parasites* [ESCCAP], 2011; Thompson *et al.*, 2008).

A presente dissertação incide sobre um estudo analítico transversal, resultante da colaboração entre a FMV-UL e a Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança e realizado para colmatar a ausência de informação epidemiológica destes parasitas em cães na região de Bragança.

Como abordagem inicial ao tema, é feita uma breve revisão bibliográfica acerca dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

2. Nota histórica

A primeira referência ao género *Cryptosporidium* remonta a 1907, quando o físico Ernest Edward Tyzzer (1875-1965) descreveu um protozoário que encontrava, com alguma frequência, nas fezes e glândulas gástricas de um rato de laboratório e cuja categoria taxonómica era desconhecida. Em 1910, Tyzzer publicou a descrição detalhada do ciclo de vida daquele protozoário e introduziu o novo género *Cryptosporidium* e a sua primeira espécie, *Cryptosporidium muris* (*C. muris*). Em 1912, após observar estádios similares a *C. muris* no intestino de um rato, Tyzzer classificou a segunda espécie do género, *C. parvum*, cujos estádios se diferenciavam pela menor dimensão e localização intestinal.

Na década de 80, o género *Cryptosporidium* foi considerado um importante agente zoonótico, após ter sido associado à morte de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Ramirez, Ward, & Sreevatsan, 2004).

Nos últimos 20 anos, a preocupação com a criptosporidiose tem-se centrado nos surtos associados à contaminação da água, nomeadamente nos países em desenvolvimento, pelo que a comunidade científica ainda procura compreender a epidemiologia deste protozoário (Fayer & Xiao, 2008).

A primeira evidência da infecção por *Cryptosporidium* spp. no cão surge em 1981, quando Saul Tzipori e Iris Campbell detetaram anticorpos (Ac) contra o parasita no soro de 80% das amostras caninas que estudavam. Em 1983, Wilson e Holscher¹ (citado por Thomaz, Meireles, Soares, Pena & Gennari, 2007) associaram a expressão clínica da infecção à imunossupressão do indivíduo infetado, quando o parasita foi encontrado num cão portador do vírus da esgana.

A primeira referência ao género *Giardia* remonta a 1681 quando Anton van Leeuwenhoek (1623-1723) observou, ao microscópio óptico, um microorganismo nas suas fezes diarreicas. Mais tarde, em 1859, o físico Vilém Dušan Lambl (1824-1895) descreveu detalhadamente o protozoário, que encontrou ao observar fezes diarreicas de crianças. Pensando tratar-se de um organismo comensal e não patogénico, Lambl classificou-o como *Cercomonas* spp.

A denominação genérica *Giardia* foi estabelecida por Joseph Kunstler (1862-1923) em 1882, ao encontrar o protozoário em girinos. Seis anos mais tarde, Raphaël Blanchard (1857-1919) propôs *Lamblia intestinalis* para definir a espécie encontrada no Homem, em homenagem a Lambl, a qual foi, mais tarde, modificada para *Giardia duodenalis* (*G. duodenalis*) por Charles Wardell Stiles (1867-1941). Charles Kofoed (1865-1947) e Elizabeth Bohn Christiansen propuseram em 1915 a nomenclatura *G. lamblia* e em 1920, *G. enterica* (Levine, 1979).

Em 1952, Francis Filice publicou, detalhadamente, a descrição morfológica do género e agrupou as espécies em três grupos morfológicos distintos: *G. lamblia*, *G. muris* e *G. agilis* (Monis, Cacciò & Thompson, 2009). Com o advento da microscopia eletrónica foi possível distinguir novas espécies, que até então se pensavam ser *G. lamblia*. Foram elas *G. psittaci*, *G. ardeae* e *G. microti*. Dada a atual aceitação pela comunidade científica, consideram-se como referentes à mesma espécie, *G. duodenalis*, *G. lamblia* e *G. intestinalis* (Adam, 2001). O primeiro estudo a evidenciar a capacidade de infecção no cão foi publicado em 1982, por Hewlett, Andrews, Ruffier e Schaefer.

3. Taxonomia

Com base na revisão à sistemática dos protozoários, o género *Cryptosporidium* está classificado no reino Protozoa, subreino Biciliata, Infrareino Alveolata, filo Miozoa, subfilo Apicomplexa, infrafilo Sporozoa, classe Coccidea, ordem Eucoccidiorida e família

¹ Wilson, R.B. & Holscher, M.A. (1983). Criptosporidiosis in a pup. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183, 1005–1006.

Cryptosporidiidae (Cavalier-Smith & Chao, 2004; Cavalier-Smith, 2003). O género *Giardia* está classificado no reino Protozoa, subreino Biciliata, infrareino Excavata, filo Metamonada, subfilo Trichozoa, superclasse Eopharyngia, classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa, ordem Giardiida e família Giardiidae (Cavalier-Smith, 2003; Plutzer, Ongerth & Karanis, 2010).

O género *Cryptosporidium* é considerado uma coccídea atípica, na medida em que se diferencia dos restantes parasitas da classe em vários aspetos: apresenta capacidade de autoinfecção, associa-se de forma invulgar à célula do hospedeiro, é relativamente inespecífico de um hospedeiro ou de um órgão e é resistente aos fármacos antimicrobianos (Tzipori & Ward, 2002). Recentemente, tem sido questionada a localização taxonómica do género; pensa-se que este género pertence a uma linhagem Apicomplexa diferente da das coccídeas, mais próxima da classe “irmã” Gregarinae, do que da classe Coccidea (Barta & Thompson, 2006; Cavalier-Smith & Chao, 2004).

3.1. Espécies do género *Cryptosporidium*

Atualmente, são reconhecidas 26 espécies do género *Cryptosporidium*, a maioria adaptada a um hospedeiro (ANEXO III).

Inicialmente, a classificação das espécies baseava-se em características fenotípicas, como a morfologia dos oocistos, ou na especificidade de hospedeiro. No entanto, as características morfológicas dos oocistos não são suficientes para diferenciar as espécies, na medida em que apenas é possível distinguir os oocistos de menores dimensões e mais esféricos dos oocistos maiores e mais ovais. Por outro lado, as espécies não são estritamente específicas para um hospedeiro, pelo que é necessário implementar outros critérios mais rigorosos para identificar e classificar novas espécies. É recomendada uma série de dados biológicos e genéticos que incluam: i) características morfológicas dos oocistos e demonstração dos estágios de desenvolvimento; ii) leque de hospedeiros naturais e experimentais; iii) caracterização biológica detalhada, incluindo localização e doença associada; iv) diagnósticos diferenciais; v) caracterização genética usando vários marcadores; vi) deposição de sequências de referência e de material infetado preservado para posterior análise; e, vii) concordância com as regras do Código Internacional da Nomenclatura Zoológica (ICZN, do inglês, *International Code of Zoological Nomenclature*) (Chalmers & Katzer, 2013; Plutzer & Karanis, 2009).

Estão identificadas diversas variantes genótípicas ou genótipos, alguns dos quais foram recentemente classificados como espécies (ANEXO III), enquanto outros permanecem com estatuto taxonómico desconhecido. A existência de múltiplas espécies e genótipos resultam, possivelmente, da resposta evolutiva de adaptação a novos hospedeiros ou de recombinação genética, especialmente nas infeções por múltiplas espécies (Huber, da Silva, Bomfim, Teixeira & Bello, 2007).

3.1.1. Espécies do género *Cryptosporidium* no cão

A espécie encontrada com maior frequência no cão é *C. canis*. Ocasionalmente têm sido reportadas infeções por *C. parvum*, *C. muris* e *C. meleagridis* em cães (Hajdusek, Ditrich & Slapeta, 2004; Lupo, Langer-Curry, Robinson, Okhuysen & Chappell, 2008; Scorza & Tangtrongsup, 2010).

A espécie *C. canis*, anteriormente classificada como genótipo canino de *C. parvum* (Morgan et al., 2000), foi definida em 2001 (Fayer, 2010). Esta espécie parece estar adaptada aos hospedeiros canídeos, mas ocasionalmente é encontrada no Homem e em bovinos (Plutzer & Karanis, 2009). O local primário de infeção de *C. canis* é o intestino delgado do hospedeiro, embora tenha sido descrito um caso de criptosporidiose gástrica num cachorro (Miller, Liggett, Radi & Branch, 2003). Crê-se ser uma espécie com alguma diversidade genética e alguns autores defendem a existência de variantes genótípicas (Fayer, 2010).

A espécie *C. parvum* infeta um vasto leque de hospedeiros parasitando principalmente bovinos e ocasionalmente o cão (ESCCAP, 2011). Esta é a espécie mais estudada até hoje e é também aquela que apresenta maior diversidade genética, com genótipos e subtipos identificados. O local primário de infeção é o intestino delgado, principalmente o íleo. Em pessoas imunodeprimidas podem ocorrer localizações extraintestinais, com envolvimento gástrico, hepatobiliar, respiratório e conjuntival, entre outros (Fayer & Xiao, 2008).

A espécie *C. muris* apresenta, também, um vasto leque de hospedeiros e infeta, principalmente, roedores. A infeção no cão, ou em outras espécies, pode estar relacionada com o acesso a roedores infetados (Lupo et al., 2008). O local primário de infeção é o estômago (Iseki, Maekawa, Moriya, Uni & Takada, 1989).

As aves são os principais hospedeiros da espécie *C. meleagridis*; esta é encontrada com alguma frequência no Homem (Hajdusek et al., 2004; Plutzer & Karanis, 2009) e está descrito, pelo menos, um caso de um cão cujo isolado foi identificado como *C. meleagridis* (Hajdusek et al., 2004); ficou por determinar, no entanto, se este cão estaria realmente infetado com a espécie e se o mesmo pode agir como seu hospedeiro natural. O local primário de infeção é o intestino delgado (Plutzer & Karanis, 2009).

3.2. Espécies do género *Giardia*

Estão descritas 6 do género *Giardia* (Tabela 1) com base nas suas diferenças morfológicas microscópicas e eletromicroscópicas (Adam, 2001).

Tabela 1. Espécies de *Giardia* spp. e seus hospedeiros. Adaptado de Monis, Caccio & Thompson, 2009.

Espécie	Hospedeiros
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos, incluindo o Homem
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores

3.2.1. Espécies do género *Giardia* no cão

A espécie *G. duodenalis* está descrita como a única capaz de infetar o cão; esta foi caracterizada como sendo um complexo de espécies, também denominadas *assemblages* ou genótipos (Monis, Andrews, Mayrhofer & Ey, 2003). Estão descritos, pelo menos, 8 *assemblages* (Lasek-Nesselquist, Welch & Sogin, 2010), diferentes geneticamente, com diferente especificidade de hospedeiros e que são representativos de diferentes linhas evolutivas (Monis *et al.*, 2009). Dada a distância genética entre cada *assemblage*, Monis *et al.* (2009) propuseram uma revisão à nomenclatura (Tabela 2).

Tabela 2. *Assemblages* de *G. duodenalis* e seus hospedeiros. Adaptado de Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010; Monis *et al.*, 2009.

<i>Assemblage</i> / Genótipo	Nomenclatura proposta	Hospedeiro suscetível
<i>Assemblage A</i>	<i>G. duodenalis</i>	Primatas incluindo o Homem, cães, gatos, ungulados, roedores e mamíferos selvagens
<i>Assemblage B</i>	<i>G. enterica</i>	Primatas incluindo o Homem, cães, equinos, bovinos, caprinos e alguns mamíferos selvagens
<i>Assemblage C e D</i>	<i>G. canis</i>	Canídeos
<i>Assemblage E</i>	<i>G. bovis</i>	Bovinos, Caprinos, Suínos
<i>Assemblage F</i>	<i>G. felis</i>	Gatos
<i>Assemblage G</i>	<i>G. simondi</i>	Roedores domésticos
<i>Assemblage H</i>	-	Vertebrados marinhos

A maioria dos *assemblages* apresenta grande especificidade para um hospedeiro (*assemblages* C, D e F) ou para um grupo de hospedeiros (*assemblages* E, G e H). Os *assemblages* A e B apresentam grande heterogeneidade genética e são capazes de infectar um vasto leque de hospedeiros (Gaydos *et al.*, 2008; Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010); alguns autores (Sprong, Cacciò & van der Giessen, 2009) defendem a divisão de ambos os *assemblages* em vários subgrupos. O *assemblage* H foi descoberto recentemente e pensa-se que tenha origem marinha, tendo sido detetado em várias focas e numa gaivota. Sabe-se que este novo *assemblage* apresenta uma sequência homóloga aos *assemblages* caninos C e D, admitindo-se a possibilidade de que tenha evoluído a partir destes (Gaydos *et al.*, 2008).

4. Biologia

Ambos os parasitas apresentam estrutura eucariota mais ou menos simples: o material genético está contido em núcleo(s) delimitado(s) por uma membrana, contêm vários organelos membranares relacionados com funções específicas e apresentam um citoesqueleto que lhes confere as formas características (Prescott, Harley & Klein, 2005). No entanto, com exceção de alguns estádios de *C. muris*, nenhum dos protozoários apresenta mitocôndrias ou complexos de Golgi convencionais (Adam, 2001; Tetley, Brown, McDonald & Coombs, 1998). Enquanto o género *Giardia* parece ser um organismo anaeróbio (Adam, 2001) derivado de um organismo flagelado aeróbio outrora com mitocôndrias (Adam, 2001; Lloyd *et al.*, 2002), *Cryptosporidium* spp. parecem dispor de ambos os metabolismos aeróbio e anaeróbio (Fayer & Xiao, 2008; Xu *et al.*, 2004).

4.1. Características morfológicas de *Cryptosporidium* spp.

4.1.1. Oocisto

O oocisto (Figura 2) é o estágio de resistência ambiental e de transmissão do parasita; é eliminado nas fezes do hospedeiro (Templeton *et al.*, 2004) e, não necessitando de período de maturação após excreção, é imediatamente infetante para um hospedeiro suscetível (Smith, Nichols & Grimason, 2005).

Esta estrutura contém quatro esporozoítos esporulados, sem esporocistos (Fayer & Xiao, 2008; Smith *et al.*, 2005); a sua forma é esférica a oval e as suas dimensões variam em função da espécie (Tabela 3).

Figura 2. Oocistos de *C. parvum* (A) e pormenor em caixa dos quatro esporozoítos (B). Microscopia eletrónica de varrimento (MEV). Adaptado de Edwards, Thompson, Koh & Clode, 2012.

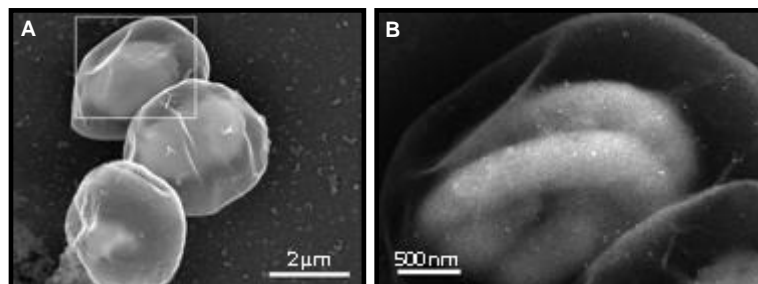


Tabela 3. Dimensões dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. das espécies identificadas no cão. Fonte: Chalmers & Katzer, 2013; ESCCAP, 2011.

Espécie	Dimensões
	Comprimento (µm) x largura (µm)
<i>C. canis</i>	5,0 x 4,7
<i>C. parvum</i>	5,0 x 4,5
<i>C. muris</i>	7,0 x 5,0
<i>C. meleagridis</i>	5,2 x 4,6

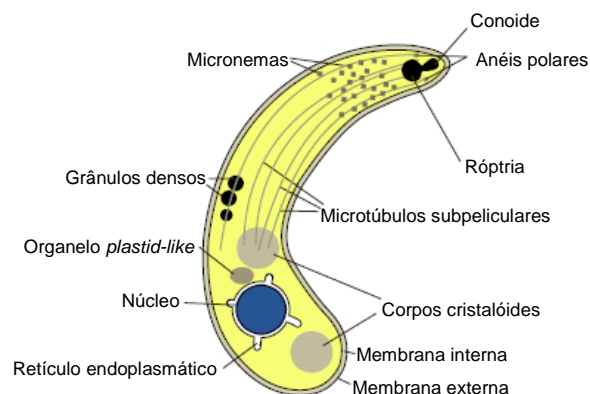
À superfície do oocisto é visível uma sutura longitudinal de natureza filamentosa, característica do género. A sutura ocupa um terço a metade do comprimento do oocisto e é o local de emergência dos esporozoítos durante o processo de desenquistamento (Smith *et al.*, 2005; Templeton *et al.*, 2004).

Foram identificadas várias proteínas na parede do oocisto, denominadas proteínas da parede do oocisto de *Cryptosporidium* (COWP, do inglês *Cryptosporidium oocyst wall protein*). Estas proteínas são codificadas por, pelo menos, nove genes; a expressão de diferentes proteínas pode estar relacionada com o tipo de parede e com a robustez do oocisto (Templeton *et al.*, 2004)

4.1.2. Esporozoíto

O esporozoíto (Figura 3) é o estágio móvel responsável pela seleção, contacto e adesão à célula do hospedeiro, sendo muito vulnerável no meio intestinal. A sua forma é semelhante a uma vírgula invertida, com a extremidade anterior cónica bem definida e a extremidade distal larga e arredondada; o seu comprimento varia entre 3,8 a 5,2µm e a largura entre 0,6 a 1,2µm (Smith *et al.*, 2005).

Figura 3. Representação esquemática do esporozoítio de *Cryptosporidium* spp. Adaptado Smith *et al.*, 2005.



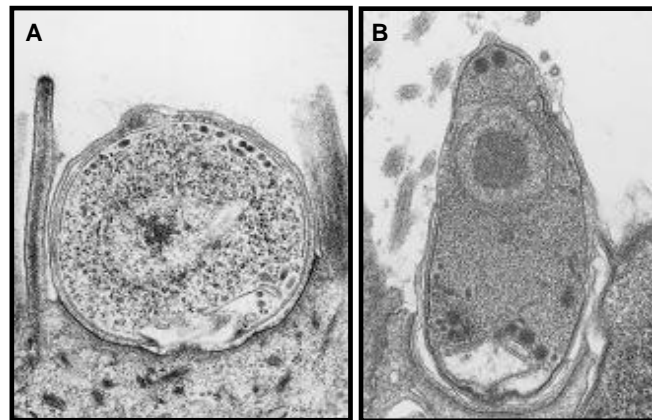
Como parasita Apicomplexa, *Cryptosporidium* spp. apresentam um complexo apical na extremidade anterior, essencial para a motilidade, contacto e adesão do parasita à célula do hospedeiro e para a formação do vacúolo parasitóforo (Smith *et al.*, 2005; Tetley *et al.*, 1998). A motilidade do esporozoítio é característica e consiste em movimentos circulares e helicoidais (Karanis & Aldeyarbi, 2011), cuja denominação precisa encontrada na literatura é *gliding motility* (Smith *et al.*, 2005).

4.1.3. Trofozoítio e merozoítos

O trofozoítio (Figura 4A) resulta da diferenciação do esporozoítio, no interior do vacúolo parasitóforo. Trata-se de uma estrutura uninuclear arredondada com um organelo alimentador e apresenta diâmetro aproximado de 1,5 a 2,5µm (Leitch & He, 2011).

Os merozoítos (Figura 4B) estão, inicialmente, no interior do meronte e são, também, estágios infetantes (Smith *et al.*, 2005); estes estágios estabelecem ciclos de reprodução assexuada (merozoítos tipo I) ou de reprodução sexuada (merozoítos tipo II). A motilidade, o mecanismo de adesão à célula hospedeira e a diferenciação em trofozoítio são semelhantes ao esporozoítio (Leitch & He, 2011).

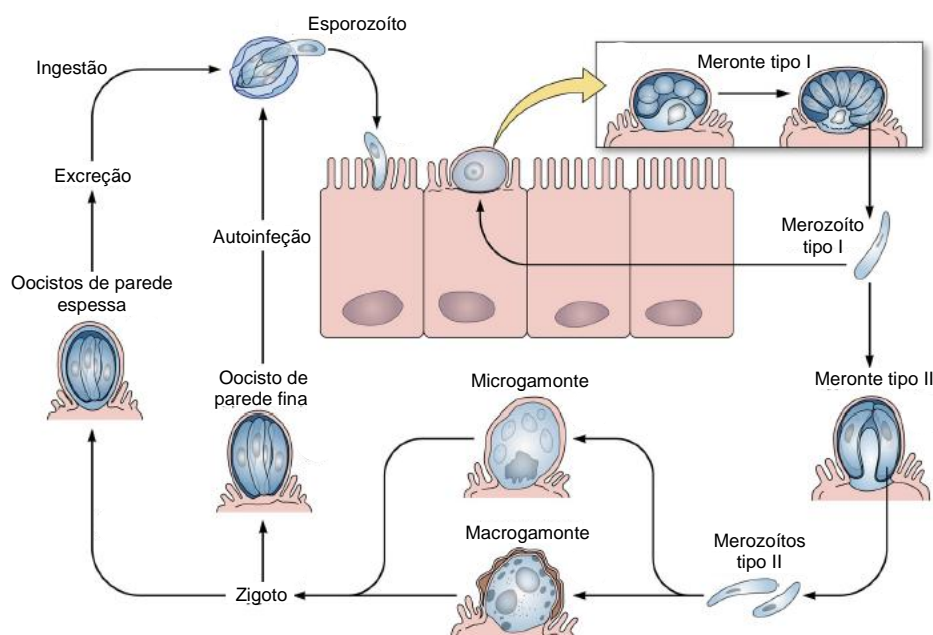
Figura 4. Trofozoíto no interior do vacúolo parasitífero (A) e merozoíto aderido ao enterócito (B), *C. parvum*, microscopia eletrônica de transmissão (MET). Adaptado de Forney, Wald, Yang, Speer & Healey, 1999.



4.2. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.

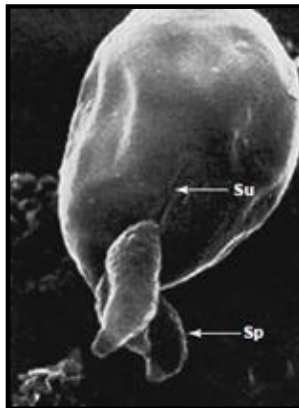
O ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. (Figura 5) é monoxeno e complexo; à semelhança das coccídeas, inclui reprodução assexuada (merogonia e esporogonia) e reprodução sexuada (gametogonia) (Havens & Davis, 1996; Leitch & He, 2011). O período pré patente de *C. canis* é de 2 a 14 dias e o período patente pode prolongar-se até 25-80 dias (ESCCAP, 2011).

Figura 5. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. Adaptado de Bouzid, Hunter, Chalmers & Tyler, 2013.



O cão infeta-se ao ingerir os oocistos. No intestino delgado, os esporozoítos são libertados, penetram na camada de muco e aderem aos enterócitos. O desenquistamento (Figura 6) é condicionado por vários fatores que incluem: i) a variação para pH alcalino no intestino após passagem pelo estômago; ii) a temperatura corporal; e, iii) as secreções biliares (Smith et al., 2005).

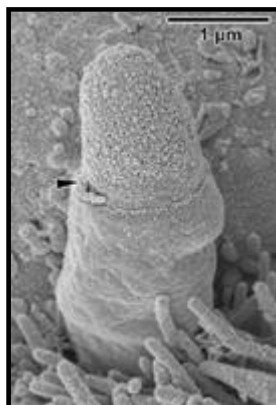
Figura 6. Desenquistamento de *Cryptosporidium* spp., MEV. Adaptado de Smith et al., 2005.



Legenda: Su. Sutura; Sp, esporozoíto.

As interações esporozoíto-célula induzem uma descarga de secreções dos organelos do complexo apical e exortam a modificação da membrana celular e a formação do vacúolo parasitóforo (Smith et al., 2005). Inicialmente, a membrana celular perde a sua natureza microvilosa e forma uma dobra em torno do parasita, alongando-se gradualmente (Figura 7); assim, o parasita é envolvido por uma dupla membrana: a membrana do vacúolo parasitóforo (Valigurová et al., 2008). O grau de protusão da membrana plasmática implica o recrutamento de cotransportadores para a interface célula-parasita e a remodelação do citoesqueleto da célula (Borowski, Clode & Thompson, 2008).

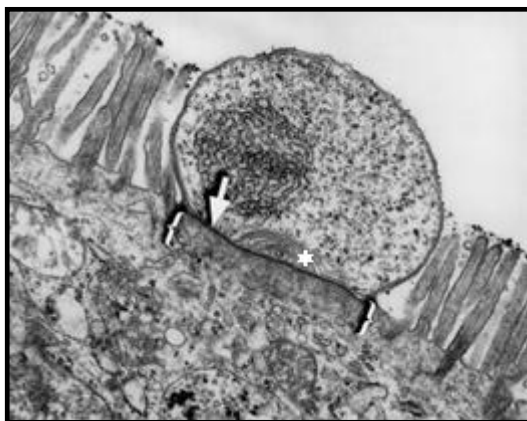
Figura 7. Envolvimento do esporozoíto de *C. muris* por uma dobra membranar (seta) e formação do saco parasitóforo, MEV. Adaptado de Valigurová et al., 2008.



Durante a formação do vacúolo parasitóforo, é formada uma estrutura lamelar na interface parasita-célula, denominada de organelo alimentador. Esta estrutura é a principal via de acesso a nutrientes do citoplasma do hospedeiro e será necessária à sobrevivência do parasita: as suas capacidades de biossíntese são limitadas e dependem de outra fonte de nutrientes (Barta & Thompson, 2006; Leitch & He, 2011). Sob o organelo alimentador, forma-se uma banda eletrodensa e uma rede de filamentos (Figura 8), cuja função pode estar relacionada com a fixação do parasita e prevenção do seu destacamento ocasional (O'Hara, Small, Chen & Larusso, 2008). À medida que o processo de internalização progride, o esporozoítio torna-se oval a esférico e evolui para o estágio de trofozoítio (Fayer & Xiao, 2008).

Ao contrário de outros Apicomplexa, *Cryptosporidium* spp. apresentam uma localização exclusiva, sem invadir o citoplasma da célula hospedeira. O parasita fica, assim, dentro de um compartimento intracelular extracitoplasmático ou epicelular, coberto pela dupla membrana da célula hospedeira e separado do citoplasma pela camada eletrodensa (Barta & Thompson, 2006). Esta localização pode ser uma forma de evasão à resposta imunitária (Borowski *et al.*, 2008) ou, na sequência da ausência de organelos funcionais como mitocôndrias, o parasita necessita de um ambiente rico em nutrientes, de forma a salvaguardar as suas necessidades metabólicas (Barta & Thompson, 2006).

Figura 8. Vacúolo parasitóforo em enterócito infectado por *Cryptosporidium* spp., MET. Adaptado de Elliott & Clark, 2000.



Legenda: seta, banda densa; chavetas, rede filamentosas; asterisco, organelo alimentador.

O trofozoítio inicia a reprodução assexuada, por divisão mitótica, da qual resulta um meronte tipo I contendo 6 a 8 merozoítos. Os merozoítos tipo I permanecem aderentes próximos do organelo alimentador. Inicialmente globosos, os merozoítos tornam-se alongados (Valigurová *et al.*, 2008). A membrana do vacúolo rotura e os merozoítos são libertados (Leitch & He, 2011). Enquanto alguns merozoítos tipo I infectam novas células epiteliais para

formar merontes tipo I em séries de ciclos assexuados, outros formam merontes tipo II, contendo 4 merozoítos (Leitch & He, 2011).

Os merozoítos tipo II libertam-se do meronte, invadem os enterócitos próximos e diferenciam-se em macrogamonte e microgamonte. Os cerca 16 microgâmetas libertam-se deste último e fertilizam um macrogamonte adjacente, resultando o único estágio diploide, o zigoto.

O zigoto diferencia-se em oocisto; este entra em esporogonia, mantendo-se aderente à membrana apical. À medida que o oocisto se diferencia, evolui para um oocisto de parede fina (constituída por uma membrana; são 20% dos oocistos) ou para um oocisto de parede espessa (constituída por três membranas; são 80% dos oocistos). Uma vez diferenciado, o oocisto solta-se da parede, rutura e reinfecta o hospedeiro no caso dos oocistos de parede fina, ou é excretado para o exterior juntamente com as fezes no caso dos oocistos de parede espessa (Havens & Davis, 1996; Leitch & He, 2011).

Foram descritos, apenas em meio experimental, estágios extracelulares denominados *gamont-like stages*. Este facto parece ser uma característica ancestral (Smith *et al.*, 2005) e leva a crer que o parasita não é intracelular obrigatório, ao contrário do que se pensava (Barta & Thompson, 2006).

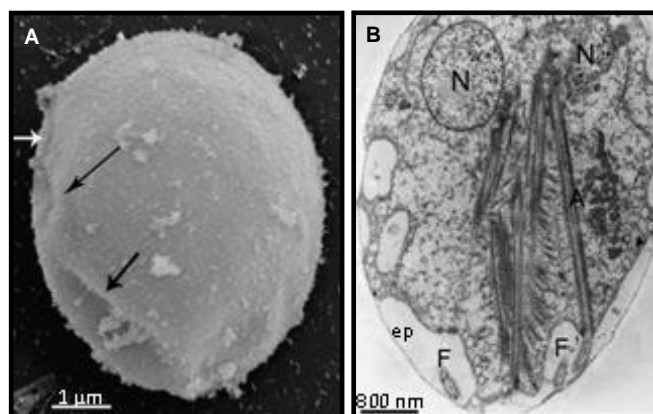
4.3. Características morfológicas de *G. duodenalis*

4.3.1. Quisto

O quisto (Figura 9) é o estágio de resistência ambiental e de transmissão do parasita. É imediatamente infetante para o hospedeiro suscetível e geralmente está presente em fezes normais dos cães assintomáticos (Barr, 2006², citado por Carlin *et al.*, 2006). Esta estrutura apresenta forma oval a elipsoidal com dimensões de 12µm de comprimento e 7µm de largura aproximadamente (Adam, 2001). Quando maturo, o quisto é constituído por 4 núcleos e pelos fragmentos do disco ventral, dos axonemas e dos flagelos (Midlej & Benchimol, 2009). Esta estrutura é limitada por uma parede, constituída por uma camada filamentosa externa e uma dupla camada interna membranosa (Adam, 2001).

² Barr S.C. (2006). Enteric protozoal infections: Giardiasis. In CE Greene (Ed), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (3rd ed.). (pp 736–752). Philadelphia: WB Saunders.

Figura 9. Quisto de *G. duodenalis*, MEV (A) e MET (B). Adaptado de Midlej & Benchimol, 2009.



Legenda: setas, fenda de encerramento; N, núcleos; F, flagelos; A, axonemas; ep, espaço peritrófico.

Estão identificadas várias proteínas na membrana externa do quisto, com predominância de três: proteína da parede do quisto 1 (CWP1, do inglês *cyst wall protein 1*), CWP2 e CWP3 (Ratner *et al.*, 2008).

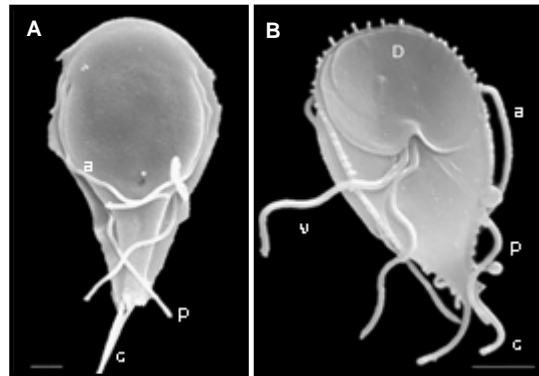
A título de curiosidade, o quisto apresenta uma taxa metabólica de apenas 10 a 20% da encontrada no trofozoíto contribuindo para a sua viabilidade no meio ambiente (Adam, 2001).

4.3.2. Trofozoíto

O trofozoíto (Figura 10) é a forma ativa do parasita, encontrado no intestino do hospedeiro e está associado à apresentação clínica da doença (Erlandsen, Macechko, Keulen & Jarrol, 1996). Ocasionalmente, é encontrado nas fezes, principalmente se estas forem diarreicas e que, devido ao aumento do peristaltismo, é expelido antes de enquistar; não sobrevive muito tempo fora do hospedeiro e, por isso, não provoca infecção (Carlin, Bowman & Scarlett, 2006). O trofozoíto apresenta forma de lágrima ou pera, achatada dorsoventralmente e com simetria bilateral. A metade anterior é relativamente rígida, ao contrário da extremidade posterior que é capaz de movimentos de flexão laterais e dorsoventrais (Elmendorf, Dawson & Mccaffery, 2003). As suas dimensões variam entre 12 e 15µm de comprimento, 5 e 9µm de largura (Adam, 2001) e cerca de 3µm de espessura (Barr, 2006³, citado por Carlin *et al.*, 2006).

³ Barr S.C. (2006). Enteric protozoal infections: Giardiasis. In CE Greene (Ed), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (3rd ed.). (pp 736–752). Philadelphia: WB Saunders.

Figura 10. Trofozoíto de *G. duodenalis*, vista dorsal (A) e vista ventral (B), MEV. Adaptado de Midlejš & Benchimol, 2009.



Legenda: a, flagelo anterior; p, flagelo posterior; c, flagelo caudal; v, flagelo ventral; D, disco ventral. Escalas: 1µm.

O trofozoíto é constituído por dois núcleos, sem nucléolos, localizados anteriormente e simétricos relativamente ao seu eixo maior (Figura 11). O citoesqueleto é constituído essencialmente por microtúbulos, e dele fazem parte o corpo mediano, o disco ventral, os funis e quatro pares de flagelos: anteriores, posteriores, caudais e ventrais (Adam, 2001; Sagolla, Dawson, Mancuso & Cande, 2006).

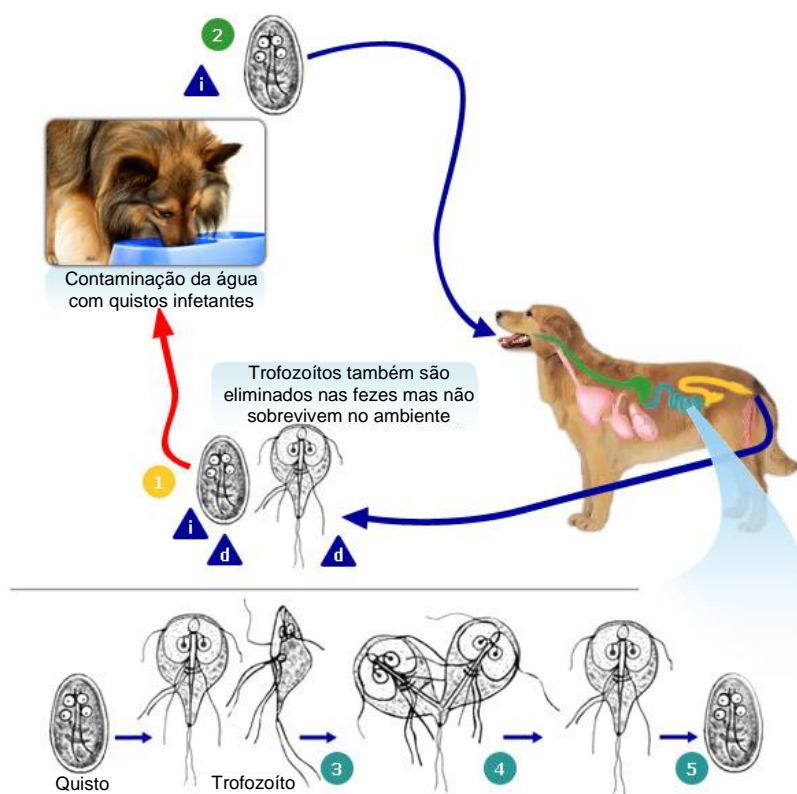
Figura 11. Trofozoíto de *G. duodenalis*, microscopia ótica. A seta indica o corpo mediano. Adaptado de Piva & Benchimol, 2004.



4.4. Ciclo biológico de *G. duodenalis*

O ciclo de vida de *G. duodenalis* é monoxeno (Figura 12) e caracteriza-se pela multiplicação dos trofozoítos no intestino delgado e pela produção intermitente de quistos, eliminados nas fezes. O período pré patente no cão é de cerca de 4 a 16 dias e o período patente pode prolongar-se por semanas a meses (ESCCAP, 2011).

Figura 12. Ciclo de vida de *G. duodenalis*. Adaptado de BayOPet, 2011.



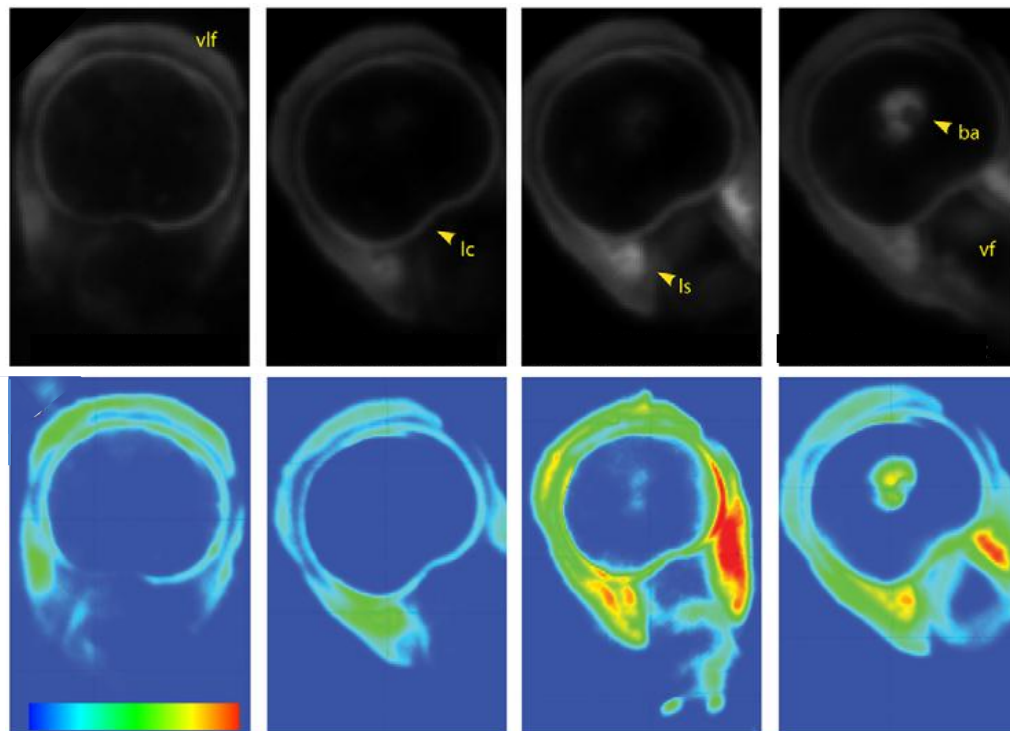
Legenda: i, estágio infeccioso; d, estágio de diagnóstico. A cor dos círculos que contêm os números remete para o segmento gastrointestinal correspondente.

O cão infeta-se ao ingerir os quistos. No duodeno, por ação do ácido gástrico e das enzimas pancreáticas, os trofozoítos sofrem desenquistamento.

Inicialmente, surgem no interior do quisto um ou dois pares de protusões citoplasmáticas e o espaço peritrófico vai aumentando à medida que o trofozoíto se separa da parede cística.

No exterior, forma-se uma abertura na parede do quisto por onde emergem os flagelos e, logo de seguida, todo o trofozoíto contendo 4 núcleos e 8 flagelos (Adam, 2001); este torna-se mais arredondado e sofre citocinese, originando dois trofozoítos (Adam, 2001; Roxström-Lindquist, Palm, Reiner, Ringqvist & Svärd, 2006). Estes tornam-se maduros, migram livremente pelo intestino ou fixam-se ao epitélio (Figura 13) e replicam-se de forma não invasiva, colonizando a mucosa intestinal (Tangtrongsup & Scorza, 2010).

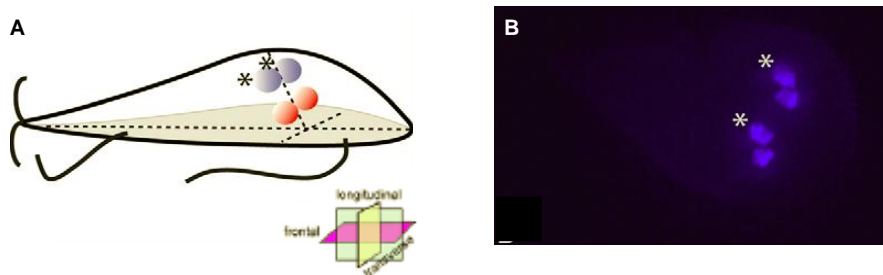
Figura 13: Adesão do trofozoíta a um substrato inerte, microscopia de reflexão interna total (em cima) e respectivas projeções de intensidade a duas dimensões (em baixo). Adaptado de House *et al.*, 2011.



Legenda: vlf, rebordo ventrolateral; lc, crista lateral; ls, escudo lateral; vf, flagelo ventral; ba, área lisa. Escala de intensidade, correspondendo a cor azul ao contacto menos forte e a cor vermelha ao contacto mais forte.

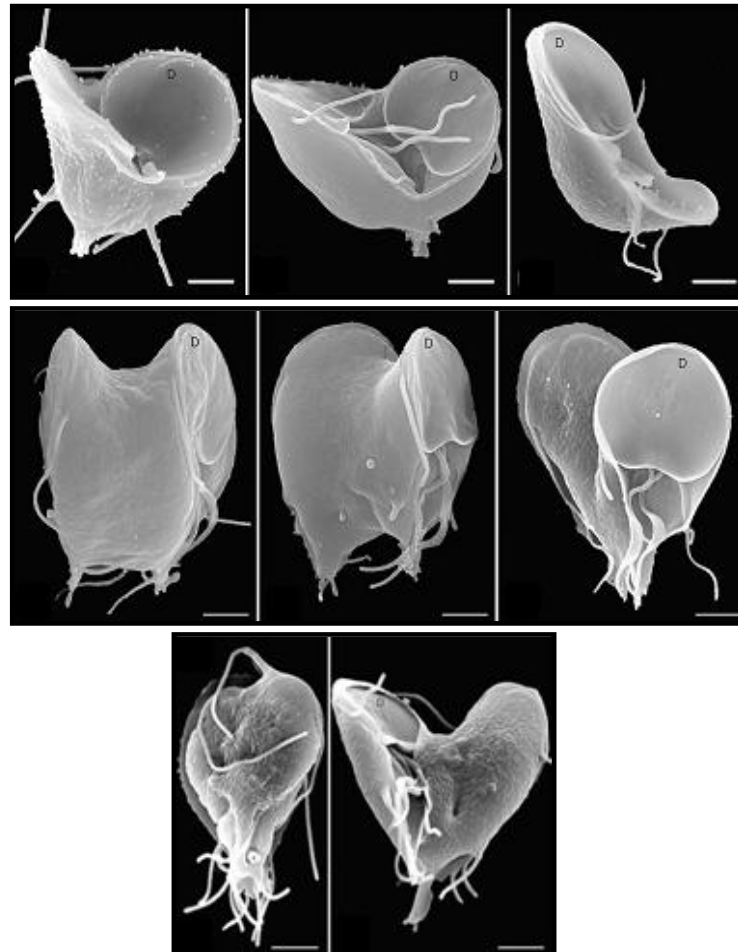
G. duodenalis, assim como as restantes espécies do género, reproduz-se assexuadamente por divisão binária. Um dos mecanismos de divisão proposto baseia-se no reposicionamento dos núcleos, deslocando-se medialmente, um para uma posição mais anteroventral e o outro mais caudodorsal. Ocorre a replicação nuclear originando um trofozoíta com quatro núcleos (Figura 14).

Figura 14. Replicação nuclear em representação esquemática a três dimensões (A) e por imunofluorescência indireta, vista dorsoventral (B). Os asteriscos indicam os núcleos dorsocaudais. Adaptado de Sagolla *et al.*, 2006.



A duplicação dos flagelos e do disco ventral precede a citocinese; esta ocorre segundo o plano longitudinal (Sagolla *et al.*, 2006) e, pelas observações de Benchimol (2004), de três formas possíveis (Figura 15).

Figura 15. Citocinese de trofozoíto de *G. duodenalis*. Divisões ventral-ventral (em cima), dorsal-dorsal (ao meio) e ventral-dorsal (em baixo), MEV. Adaptado de Benchimol, 2004.



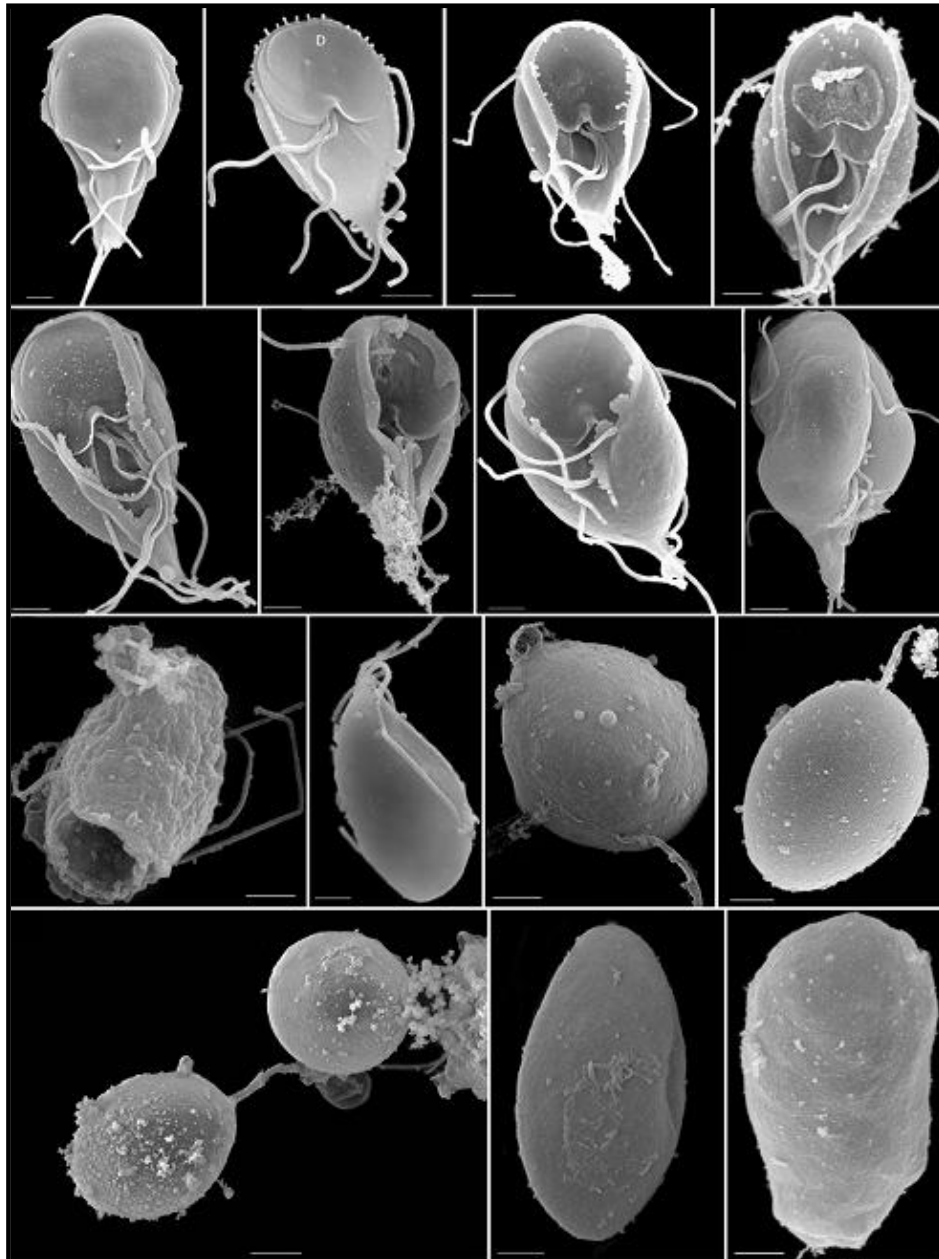
Legenda: D, disco ventral. Escalas 2 µm.

Não estando comprovada a existência de reprodução sexuada no género *Giardia*, pensa-se que este parasita manteve parte da capacidade meiótica e de cruzamento cromossómico e que, em alguma fase do seu ciclo de vida, possa sofrer recombinação genética. Este facto proporcionará uma vantagem evolutiva em resposta à pressão de seleção, causada pela exposição a fármacos anti-giardia ou pela competição do ambiente com outras coinfeções (Hopkins *et al.*, 1999⁴, citado por Monis *et al.*, 2009).

⁴ Hopkins, R., Constantine, C., Groth, D., Wetherall, J., Reynoldson, J. & Thompson, R. (1999). PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitology*, 118, 531–539.

A diferenciação do trofozoíto em quisto ocorre entre o jejuno e o cólon (Figura 16). Algumas das condições que estimulam o enquistamento estão relacionadas com a resposta do hospedeiro e outras condições de stress como o aumento do pH, a presença de ácidos biliares conjugados e ácidos gordos e o esgotamento de nutrientes, nomeadamente de colesterol (Adam, 2001; Midlej & Benchimol, 2009).

Figura 16. Enquistamento de trofozoíto de *G. duodenalis*, MEV. Adaptado de Midlej & Benchimol, 2009.

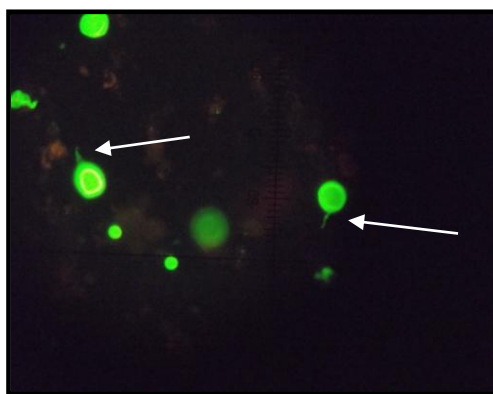


Legenda: D, disco ventral. Escalas 1 μ m.

As últimas estruturas a serem incorporadas são os flagelos caudais; antes de recolherem, são englobados pela membrana, formando um género de cauda que é visível nos quistos imaturos (Figura 17).

Na fase final, o quisto ainda não está totalmente encerrado e é possível visualizar um género de fenda, que evolui para um opérculo, que não é visível quando o quisto encerra por completo. Esta zona pode apresentar maior fragilidade e, possivelmente, pode ser o ponto de abertura da parede do quisto aquando do desenquistamento (Midlej & Benchimol, 2009).

Figura 17. Quistos imaturos de *G. duodenalis* (setas), imunofluorescência direta 400x. Fonte original.



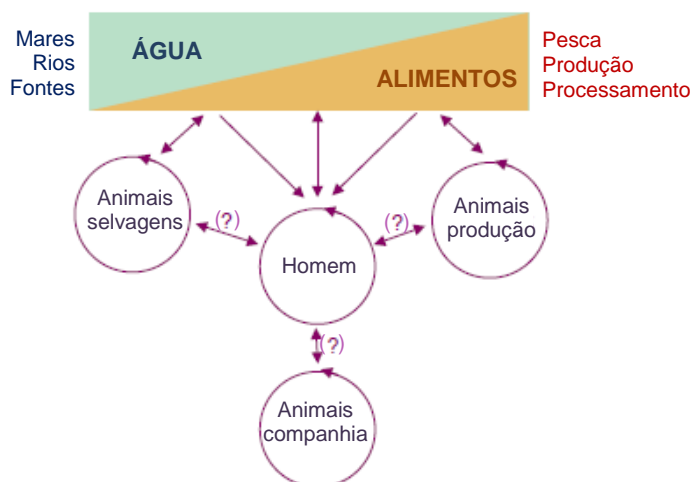
5. Epidemiologia

A transmissão de *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* ocorre por via fecal-oral ou, indiretamente, pela ingestão de água e alimentos contaminados e pelo contacto com superfícies contaminadas (Hunter & Thompson, 2005). O cão infeta-se por coprofagia, por ingestão acidental do parasita durante a sua higiene ou por ingestão de água ou alimentos contaminados (Scorza & Tangtrongsup, 2010).

A epidemiologia da infeção por ambos os parasitas caracteriza-se por vários aspetos:

a) estão descritos vários ciclos de transmissão, que conferem a tenacidade e a ubiquidade aos parasitas (Figura 18). O género *Cryptosporidium* é mantido por ciclos envolvendo, principalmente, animais de produção; no género *Giardia* os ciclos envolvendo animais selvagens e de companhia parecem ser de especial importância. Os ciclos perpetuam-se, independentemente de haver interação entre eles; a frequência com que essa interação ocorre é desconhecida (Hunter & Thompson, 2005);

Figura 18. Ciclos de transmissão de *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis*. Adaptado de Hunter & Thompson, 2005.



Legenda: (?), frequência de transmissão desconhecida.

b) Os oocistos e quistos são imediatamente infetantes para outros hospedeiros suscetíveis, apresentam várias vias de transmissão e a dose infetante é baixa; no Homem, apenas 1 a 10 oocistos ou quistos (Iii, Johnson, Hsu & Rice, 1991; Okhuysen, Chappell, Crabb, Sterling & DuPont, 1999) podem ser suficientes para que ocorra infeção; não se conhecem dados acerca das doses infetantes nos animais de companhia. Alguns dos animais infetados podem excretar grandes quantidades de oocistos e quistos (Thompson, 2004; Tzipori & Ward, 2002) contaminando o ambiente e, conseqüentemente, a água e os alimentos, propiciando à dispersão dos parasitas;

c) Os oocistos e os quistos são muito resistentes no meio ambiente; apesar de serem suscetíveis à dissecação, estes estágios podem sobreviver até vários meses em ambiente húmido e frio e podem resistir aos tratamentos convencionais das águas, representando um risco para a saúde pública (ESCCAP, 2011; Tangtrongsup & Scorza, 2010);

d) Para nenhum dos parasitas está disponível uma terapêutica 100% eficaz (ESCCAP, 2011; Fiechter, Deplazes & Schnyder, 2012).

Relativamente ao género *Cryptosporidium*, acrescenta-se o facto de este apresentar capacidade de autoinfeção, permitindo a persistência do agente no hospedeiro infetado (Tzipori & Ward, 2002).

5.1. Prevalência

A prevalência dos parasitas varia em função da população em estudo, das técnicas de diagnóstico usadas, da experiência do analista e da excreção intermitente dos parasitas (Epe, Rehker, Schnieder, Lorentzen & Kreienbrock, 2010; Palmer *et al.*, 2008).

O estudos realizados em Portugal continental estimam que a prevalência de *Cryptosporidium* spp. ronda os 18% em cães de canis municipais e de abrigo (Lebre, 2011) e os 11% em cães errantes (Santos, 2014).

O género *Giardia* é um dos endoparasitas mais frequentes no cão (Anderson *et al.*, 2004; Carlin *et al.*, 2006; Epe *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Ortuño & Castellà, 2011; Zanzani, Gazzonis, Scarpa, Berrilli & Manfredi, 2014); a sua prevalência, em Portugal continental, estima-se que ronde os 22% em canis de criação (Fernandes, 2012), os 61% em canis municipais e de abrigo (Ferreira *et al.*, 2011; Lebre, 2011), os 32,5% em cães errantes (Santos, 2014) e os 1,3% na população canina com proprietário (Ferreira *et al.*, 2011).

5.2. Importância zoonótica

Os géneros *Cryptosporidium* e *Giardia* são dois importantes agentes causadores de diarreia e de alterações nutricionais no Homem, com maior relevância em crianças, grávidas e portadores de imunodeficiências. Ambos os parasitas estão inseridos na *Neglected Diseases Initiative* e no grupo dos agentes causadores da diarreia dos viajantes (Savioli, Smith & Thompson, 2006; *World Health Organization* [WHO], 2005). Ambos estão associados ao nível socioeconómico do país, tendo principal importância em comunidades e instituições de países em desenvolvimento (Savioli *et al.*, 2006), onde a prevalência de *Cryptosporidium* spp. no Homem pode atingir os 20% (*The Center for Food Security & Public Health*, 2005) e a prevalência de *G. duodenalis* 30% (*The Center for Food Security & Public Health*, 2012). Estudos realizados em Portugal estimam que a prevalência de *Cryptosporidium* spp. no Homem ronda os 3%, estando associada a portadores de SIDA; a prevalência de *G. duodenalis* em crianças varia entre 2.5% e 7% (Almeida *et al.*, 2006a; Ferreira *et al.*, 2013; Júlio *et al.*, 2012). Estes valores estão de acordo com aqueles descritos em outros países europeus (*The Center for Food Security & Public Health*, 2012; WHO, 2006).

As infeções por *Cryptosporidium* spp. no Homem estão maioritariamente associadas às espécies *C. hominis* e *C. parvum* (Almeida *et al.*, 2006b; Xiao *et al.*, 2007). *C. hominis* parece ser estrita do Homem, sendo mantida pelo ciclo antroponótico, e pensa-se que as crianças possam representar o principal reservatório da infeção. *C. parvum* é a espécie zoonótica mais declarada e os principais reservatórios são os bovinos e o Homem, sendo excecionalmente encontrada no cão. Esta espécie é mantida pelos ciclos antroponótico e zoonótico, no qual o cão terá pouca importância (Hunter & Thompson, 2005).

No cão, as infeções estão maioritariamente associadas à espécie *C. canis* (Huber *et al.*, 2007; Palmer *et al.*, 2008; Thomaz *et al.*, 2007). São conhecidos poucos casos de infeção

por esta espécie no Homem e estes envolvem não só pessoas imunodeprimidas como também imunocompetentes; no entanto, pensa-se que os casos de *C. canis* no Homem sejam resultado de transmissão antroponótica e não zoonótica. Em alguns estudos: i) foi encontrada apenas uma fraca associação entre pessoas imunodeficientes infetadas com *Cryptosporidium* spp. e o contacto com cães; ii) não foi encontrada associação entre o contacto com animais de companhia e a doença; ou, iii) o contacto com animais de companhia parece ser um fator protetor da doença (Lucio-Forster, Griffiths, Cama, Xiao & Bowman, 2010; Xiao *et al.*, 2007). Está descrito um caso de possível transmissão zoonótica, envolvendo um cão e duas crianças a viverem na mesma casa (Xiao *et al.*, 2007). Os autores do estudo consideram a possibilidade de transmissão antrozooponótica, uma vez que na comunidade não surgiram mais casos de infeção para que a causa se deva à contaminação da água; no entanto, os mesmos autores não afastam a hipótese de que, sendo esta espécie transmitida por via antroponótica, tenham sido as crianças a infetar o cão.

As infeções por *G. duodenalis* no Homem estão associadas aos *assemblages* A ou B; ambos apresentam um vasto leque de hospedeiros e podem ser encontrados no cão, mais frequentemente o A e ocasionalmente o B (Ferreira *et al.*, 2011; Overgaauw *et al.*, 2009; Riggio, Mannella, Ariti & Perrucci, 2013; Scaramozzino *et al.*, 2009; Upjohn *et al.*, 2010; Zanzani *et al.*, 2014). Os *assemblages* caninos C e D ainda não foram confirmados em pessoas infetadas com *G. duodenalis* (Bowman & Lucio-Forster, 2010).

A transmissão zoonótica de ambos os *assemblages* A e B não está absolutamente demonstrada e pensa-se que a principal fonte de infeção de *G. duodenalis* para o Homem seja a transmissão antroponótica (Robertson, Irwin, Lymbery & Thompson, 2000). Alguns autores (Anuar, Azreen, Salleh & Moktar, 2014; Upjohn *et al.*, 2010) defendem a existência de dois ciclos de transmissão a ocorrer no cão: i) um ciclo de transmissão dos *assemblages* C e D, adaptados à espécie canina, favorecido pelo contacto intensivo entre um grande número de animais a viver juntos, como nos canis; estes *assemblages* tendem a predominar no seu respetivo hospedeiro como resultado da exclusão competitiva com outros *assemblages*; e, ii) um segundo ciclo que inclui a transmissão cruzada de *assemblages* do Homem, nomeadamente o *assemblage* A; a frequência de transmissão cão-cão ocorrerá de forma menos frequente e nesta situação as infeções com o *assemblage* A principalmente, tendem a persistir. Enquanto alguns estudos suportam esta teoria (Ferreira *et al.*, 2011; Riggio *et al.*, 2013; Upjohn *et al.*, 2010), com outros (Overgaauw *et al.*, 2009; Scaramozzino *et al.*, 2009; Zanzani *et al.*, 2014) não acontece o mesmo.

Traub *et al.* (2004) encontrou uma relação significativa entre a presença de um cão positivo a *Giardia* spp. e a presença de um humano positivo a *Giardia* spp. a viver no mesmo lar. Recentemente, relativamente ao *assemblage* A, Anuar, Azreen, Salleh & Moktar (2014) encontraram um risco de infeção 2.6 vezes superior em pessoas que mantinham contacto muito próximo com um animal doméstico, em que este tinha acesso à rua em pelo menos uma parte do dia; este facto não é significativo para o *assemblage* B (Anuar *et al.*, 2014). Ambos os estudos ocorreram em comunidades onde a doença é endémica; será nestes locais que haverá alguma expressão zoonótica, nomeadamente do *assemblage* A (Traub *et al.*, 2004). Assim, o papel do cão na transmissão zoonótica de *G. duodenalis* claramente depende da interação entre o cão e o Homem, nomeadamente nas áreas endémicas (Takumi *et al.*, 2012). Dada a aparente facilidade com que a transmissão ocorre entre cães, também os proprietários com múltiplos cães em casa (Bugg, Robertson, Elliot & Thompson, 1999), assim como o pessoal a trabalhar em canis, os médicos veterinários e os enfermeiros podem estar sujeitos a maior risco de infeção (Papini, Gorini, Spaziani & Cardini, 2005).

Assim, as infeções, quer por *Cryptosporidium* spp. quer por *Giardia* spp., não parecem ser partilhadas entre cães e Homens, em circunstâncias regulares; o cão infeta-se com o seu núcleo de parasitas e o Homem parece ter o seu conjunto de parasitas antroponóticos (Bowman & Lucio-Forster, 2010). Logo, na maior parte das situações e com exceção dos indivíduos imunodeprimidos, o cão representa um risco mínimo para os seus donos, comparando com outras fontes de infeção potenciais, como a água de bebida, instituições, piscinas, viagens para locais com baixos níveis de higiene ou deficiente purificação da água (Bowman & Lucio-Forster, 2010).

6. Patogenia

Os estudos acerca da patogenia de *Cryptosporidium* spp. e de *G. duodenalis* no cão são limitados e a maioria das referências são extrapolações do conhecimento das infeções no Homem, em modelos laboratoriais com roedores ou em culturas *in vitro* (Carlin *et al.*, 2006; Leitch & He, 2011).

Ambos os parasitas se localizam à superfície das células e, por isso, são considerados pouco invasivos; o mecanismo patogénico é multifatorial e o principal envolvido é a forte resposta do hospedeiro (Deng, Rutherford & Abrahamsen, 2004).

6.1. Resposta imunitária a *Cryptosporidium* spp.

O contacto e a invasão à célula hospedeira ocorrem por meio de ligandos localizados na superfície do esporozoítio e nas secreções apicais, que interagem com recetores das células

epiteliais. Assim, são ativados e manipulados uma série de sinais celulares que alteram a função dos enterócitos com remodelação do citoesqueleto, rearranjo de actina e recrutamento de transportadores e canais para a interface parasita-hospedeiro (Leitch & He, 2011).

Os principais antígenos do parasita são proteínas expressas à sua superfície ou são proteínas secretadas pelos organelos do complexo apical e incluem a glicoproteína gp40/15 (também denominada GP60 ou S60), a proteína *circumsporozoite-like* (CSL) e a glicoproteína gp900, entre outros (Borad & Ward, 2010; Bouzid *et al.*, 2013).

A primeira resposta imunitária, inata, envolve a secreção de citocinas pró-inflamatórias, de reguladores imunitários e de produtos antimicrobianos. Segue-se o recrutamento de linfócitos para a lâmina própria da mucosa infetada (Deng *et al.*, 2004) e a resposta celular de linfócitos T, predominantemente por via de células CD4+ e interferão- γ . O parasita estimula a resposta humoral, com produção de imunoglobulinas (Ig) M, IgG e IgA específicas. O papel protetor dos Ac ainda é dúvida; alguns estudos usando ratos com deficiência de linfócitos B concluíram que estas células não são essenciais para a resistência ou recuperação da infecção; por outro lado, pacientes com SIDA e infetados cronicamente por *Cryptosporidium* spp. apresentam altos títulos de IgG e IgA específicas contra o parasita (Borad & Ward, 2010; Leitch & He, 2011).

O processo inflamatório ao nível da mucosa leva a atrofia difusa das microvilosidades, a perda da bordadura em escova e das glândulas das criptas intestinais, a apoptose celular e consequente aumento da permeabilidade intestinal (Savioli *et al.*, 2006; Scorza & Tangtrongsup, 2010). A apoptose celular é inibida pelo parasita na fase inicial da infecção, que depende da célula para crescer e se desenvolver; nos estádios seguintes, a apoptose celular é induzida e pode ocorrer em massa (Deng *et al.*, 2004; Leitch & He, 2011). As evidências da produção de uma enterotoxina pelo parasita são mínimas (Leitch & He, 2011). Este processo desencadeia a diarreia por má absorção de eletrólitos e nutrientes associada a hipersecreção de cloro e água (Scorza & Tangtrongsup, 2010).

6.2. Resposta imunitária a *G. duodenalis*

Os principais antígenos reconhecidos pelo hospedeiro são as proteínas de superfície variantes (VSP, do inglês *variant-specific surface protein*). As VSP cobrem toda a superfície do trofozoíto incluindo disco ventral e flagelos. A sua expressão à superfície varia espontaneamente. Dos cerca de 200 genes VSP codificados no genoma do parasita, apenas um, de cada vez, é expresso à superfície da célula, com exceção do momento da troca. A variação antigénica permite inativar as respostas imunitárias do hospedeiro e a sua

adaptação a diferentes ambientes (Nash, 2002; Prucca & Lujan, 2009). Outros antígenos do parasita incluem: as CWP, já referidas anteriormente como sendo as principais proteínas à superfície do quisto (Ratner *et al.*, 2008); as giardinas, que são as principais proteínas do disco ventral e, possivelmente, os primeiros antígenos a serem detectados localmente após a adesão do trofozoíto à mucosa (Faubert, 2000); as tubulinas, que juntamente com as giardinas, constituem a maioria das proteínas associadas aos microtúbulos do citoesqueleto; e, entre outros, as lectinas, presentes à superfície do trofozoíto e cuja função pode estar relacionada com a adesão do mesmo (Faubert, 2000).

Pensa-se que a infecção por *G. duodenalis* exorte algum grau de imunidade, nomeadamente do tipo humoral, de longo prazo. Esta será a razão pela qual a maioria dos animais infetados se apresenta assintomático ou consegue autolimitar ou eliminar a infecção. No entanto, a produção de Ac capazes de eliminar o parasita pode demorar vários meses e é limitada na resistência a reinfeções (ESCCAP, 2011; Gates & Nolan, 2009; Thompson, 2004).

Em alguns casos de giardiose crónica, o parasita induz uma resposta linfocítica supressora, refletindo-se a nível intestinal numa certa tolerância imunitária aos antígenos do parasita, semelhante à que ocorre relativamente aos antígenos da dieta. O hospedeiro torna-se assim “tolerante” ao protozoário, excretando baixos níveis de Ac (Olson, Hannigan, Gaviller & Fulton, 2001; Rishniw, Liotta, Bellosa, Bowman & Simpson, 2010).

A libertação de substâncias citopáticas pelo parasita, a alteração da flora bacteriana normal e inibição da função enzimática dos enterócitos leva à resposta inflamatória do hospedeiro, com produção de citocinas e inflamação da mucosa (Gardner & Hill, 2001), rutura das microvilosidades, alterações na motilidade intestinal, indução da apoptose dos enterócitos e aumento da esfoliação celular. Será este processo inflamatório que está na origem da diarreia por má absorção e hipersecreção intestinal (Carlin *et al.*, 2006; Tangtrongsup & Scorza, 2010).

7. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* pode representar um desafio para o médico veterinário.

7.1. Diagnóstico Clínico

No cão, a infecção por ambos os parasitas é geralmente assintomática ou autolimitante; as suas manifestações clínicas estão associadas a cachorros e a cães imunodeprimidos ou com doenças crónicas, principalmente se estiverem presentes outras infeções (ESCCAP, 2011; Scorza & Tangtrongsup, 2010; Tangtrongsup & Scorza, 2010); nestes animais, a

infecção pode manifestar-se com gravidade e elevado grau de morbidade ou evoluir para um quadro crónico (Morgan *et al.*, 2000).

O principal sintoma da infecção por *Cryptosporidium* spp. no cão é a diarreia aquosa com mau odor e não associada a muco, hematoquézia, melena ou disquézia (Scorza & Tangtrongsup, 2010). Geralmente a diarreia começa alguns dias após o início da excreção dos oocistos, pode prolongar-se durante dias a semanas e pode ser acompanhada por desconforto abdominal, hipertermia ou, raramente, vômito (ESCCAP, 2011); nos casos crónicos, a diarreia é intermitente e a perda de peso pode ser evidente (Morgan *et al.*, 2000; Scorza & Tangtrongsup, 2010). À palpação abdominal, os intestinos sentem-se espessados (Scorza & Tangtrongsup, 2010).

O principal sintoma da infecção por *G. duodenalis* no cão é a diarreia aguda ou intermitente, de consistência pastosa a aquosa, por vezes acompanhada de muco e esteatorreia. Podem estar associados desconforto abdominal moderado a forte, anorexia, vômito e letargia e, nos casos crónicos, perda de peso (Tangtrongsup & Scorza, 2010; ESCCAP, 2011). Foram descritas reações de dermatite alérgica secundárias à infecção, possivelmente na sequência da indução, pelo parasita, do transporte macromolecular de antigénios alimentares para a circulação sanguínea originando reações de hipersensibilidade (Olson *et al.*, 2001).

Qualquer paciente que se apresente à consulta com sinais gastrointestinais deve ser rastreado para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (Carlin *et al.*, 2006; Chalmers & Katzer, 2013) e os diagnósticos diferenciais devem incluir outras causas de má digestão e má absorção, como insuficiência pancreática exócrina, doença inflamatória crónica e linfangiectasia (Carlin *et al.*, 2006).

7.2. Diagnóstico laboratorial e radiológico

As análises sanguíneas estão normais ou apresentam alterações inespecíficas relacionadas com desidratação e depleção de eletrólitos, nos casos em que a diarreia é grave. Na radiologia abdominal pode ser visível aumento do ar e da densidade dos tecidos abdominais característicos de conteúdo fluido intestinal (Scorza & Tangtrongsup, 2010; Tangtrongsup & Scorza, 2010).

A confirmação do diagnóstico passa, então, pela identificação dos parasitas ou dos seus antigénios nas fezes (Carlin *et al.*, 2006).

7.2.1. Microscopia convencional

As técnicas baseadas na microscopia convencional são muito úteis devido ao seu baixo custo e fácil execução e podem ser realizadas em qualquer laboratório ou clínica veterinária que tenha um microscópio ótico. A sensibilidade no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. depende da técnica utilizada, da experiência do analista e do número de amostras, por animal, examinadas (Chalmers & Katzer, 2013).

a) Esfregação direto

Os quistos e trofozoítos de *Giardia* spp. podem ser identificados mediante a realização de um esfregação direto. Os trofozoítos são facilmente detetados pelos movimentos característicos em “queda de folha” (Tangtrongsup & Scorza, 2010). No entanto, são muito frágeis e decompõe-se rapidamente (Carlin *et al.*, 2006), pelo que as fezes devem ser muito frescas e conter muco ou, se possível, recolhidas diretamente da ampola retal. A adição de corantes, como o soluto de lugol, o azul metileno ou o verde de metilo, ajuda à visualização das estruturas internas (Tangtrongsup & Scorza, 2010). Para identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., esta técnica é de baixa sensibilidade, pois o parasita apresenta dimensões muito reduzidas e é excretado em pequena quantidade nos pequenos animais, sendo difícil de identificar (Scorza & Tangtrongsup, 2010; Vohra, Sharma & Chaudhary, 2012).

b) Esfregação fecal corado

Este é o método de eleição e o mais usado para identificar os oocistos de *Cryptosporidium* spp. (ESCCAP, 2011). Existem várias técnicas de coloração que permitem diferenciar os oocistos de outros protistas e detritos (Jex, Smith, Monis, Campbell & Gasser, 2008), tais como a coloração por Ziehl-Neelsen, pela safranina (ESCCAP, 2011), pelo azul de metilo ou pelo Giemsa (Baxby & Blundell, 1983⁵, citado por Pereira da Fonseca, 2000). Os oocistos aparecem como pequenas esferas com cor vermelha ou alaranjada (ESCCAP, 2011).

As técnicas de coloração apresentam baixo custo, são de fácil execução (Jex *et al.*, 2008) e podem ser realizadas como abordagem inicial a um animal com diarreia, em qualquer clínica veterinária que tenha um microscópio ótico (Scorza & Tangtrongsup, 2010). A sua principal limitação é a variável sensibilidade, que pode ser muito reduzida em amostras com poucos oocistos (Chalmers & Katzer, 2013; Jex *et al.*, 2008; Pereira da Fonseca, 2000); alguns estudos no Homem (Khurana, Sharma, Sharma & Malla, 2012; Morgan *et al.*, 1998; Zagloul,

⁵ Baxby, D. & Blundell, N. (1983). Sensitive, rapid, simple methods for detecting *Cryptosporidium* in faeces. *The Lancet*, 322(8359), 1149.

Mohamed, Khodari & Farooq, 2013) obtiveram valores de sensibilidade, usando a técnica de Ziehl-Neelsen modificada, entre 54.8% e 83.7%; um estudo realizado em bovinos (Pereira da Fonseca, 2000) estimou a sensibilidade da mesma técnica, após concentração, entre 89% e 99%. Alguns oocistos podem absorver menos corante sendo difícil diferenciá-los de detritos esféricos com tamanho similar que coram de vermelho (Khurana *et al.*, 2012; Pereira da Fonseca, 2000). O material fecal a utilizar pode ser fresco, refrigerado ou preservado em fixadores químicos (Chalmers & Katzer, 2013; Manser *et al.*, 2013); em amostras congeladas, um outro estudo realizado em bovinos (Brook, Christley, French & Hart, 2008) obteve uma elevada sensibilidade, com esta técnica, na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. De forma a contornar a excreção intermitente do parasita e aumentar a sensibilidade da técnica é recomendado a recolha de amostras de dois a três dias consecutivos do mesmo animal (Chalmers & Katzer, 2013; Savioli *et al.*, 2006).

Não sendo a técnica de eleição para diagnóstico de *Giardia* spp., cuja sensibilidade pode atingir 81.5%, é usada frequentemente pela vantagem de detetar ambos os parasitas, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (Fernandes, 2012).

c) Técnicas de concentração

É recomendada a concentração dos quistos (ESCCAP, 2011), por flutuação ou sedimentação antes da visualização microscópica, de forma a aumentar a sensibilidade do diagnóstico e, idealmente, deve incluir centrifugação. A flutuação é a técnica tradicionalmente utilizada para pesquisa de *Giardia* spp. (Tangtrongsup & Scorza, 2010), não sendo a mais apropriada para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp., devido às suas dimensões reduzidas (Scorza & Tangtrongsup, 2010). As soluções mais comuns são a de sulfato de zinco e a de sacarose; a última solução é hipertónica e distorce os quistos, dificultando a sua identificação. O material fecal a analisar pode ser fresco ou refrigerado mas não congelado (Tangtrongsup & Scorza, 2010) e a preparação deve ser observada em 15 a 20 minutos, pois os quistos, se presentes, acabam por colapsar; as lâminas que não puderem ser observadas de imediato devem ser refrigeradas (Tangtrongsup & Scorza, 2010). Devido à excreção intermitente de quistos, a análise de pelo menos três amostras, recolhidas entre três a cinco dias, aumenta a sensibilidade da técnica (ESCCAP, 2011; Rishniw *et al.*, 2010). Apesar da sensibilidade variável, entre 34% e 91% (Fernandes, 2012; Guerden, Berkvens, Casaert, Vercruysse & Claerebout, 2008; Mekaru, Marks, Felley, Chouicha, & Kass 2007; Rimhanem-Finne, Enemark, Kolehmainen, Toropainen & Hanninen, 2007; Rishniw *et al.*, 2010), a flutuação permite identificar coinfeções parasitárias e não deve ser substituída por outra mais sensível, mas sim associada a esta (Tangtrongsup & Scorza, 2010).

7.2.2. Microscopia de fluorescência

Estão descritas técnicas de coloração de esfregaços fecais para observação ao microscópio de fluorescência, à base de auramina, para detecção de *Cryptosporidium* spp. Os oocistos surgem fluorescentes, pelo que são facilmente detetados e as lâminas podem ser observadas com menor ampliação, levando menos tempo que as outras técnicas microscópicas. No entanto, a necessidade de microscópio de fluorescência e as incertas sensibilidade e especificidade limitam a utilização desta técnica (Chalmers & Katzer, 2013; Garcia, Bruckner, Brewer & Shimizu, 1983; Khurana *et al.*, 2012; Vohra *et al.*, 2012). O material fecal a utilizar pode ser fresco, refrigerado, congelado ou preservado quimicamente (Chalmers & Katzer, 2013; Garcia *et al.*, 1983; Manser *et al.*, 2013).

7.2.3. Técnicas Imunológicas

O material fecal a utilizar nas técnicas imunológicas pode ser fresco, refrigerado, congelado ou, na maioria dos testes comerciais disponíveis, preservado em fixadores químicos (Chalmers & Katzer, 2013; Manser *et al.*, 2013).

a) Coproscopia por imunofluorescência

A imunofluorescência direta (IFD) é considerada, por alguns autores, a técnica mais indicada para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (Guerden *et al.*, 2008; Mekaru *et al.*, 2007; Rishniw *et al.*, 2010), principalmente em amostras conservadas a longo prazo (Morimoto, Komatsu, Nishida & Sugiura, 2001). Os anticorpos monoclonais (Acm) marcados com fluoresceína são dirigidos contra as proteínas da parede dos oocistos e dos quistos; os oocistos e quistos aparecem como pequenas esferas ou corpos ovais, respetivamente, exibindo fluorescência verde maçã, sobre um fundo livre de fluorescência inespecífica (Garcia, Shum & Bruckner, 1992). Estão disponíveis no mercado testes comerciais que detetam simultaneamente *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

Trata-se de uma técnica de elevada especificidade e sensibilidade, acima de 90%, na detecção dos oocistos (Alles, Waldron, Sierra & Mattia, 1995; Barugahare, Dennis, Becker & Slapeta, 2011; Chalmers & Katzer, 2013; Garcia *et al.*, 1992) e dos quistos (Garcia *et al.*, 1992; Guerden *et al.*, 2008; Rishniw *et al.*, 2010). No entanto, para alguns autores (Pereira da Fonseca, 2000), esta técnica não se revelou mais sensível que a técnica de Ziehl-Neelsen modificada.

A IFD permite a confirmação visual dos oocistos e quistos (Tangtrongsup & Scorza, 2010), e por isso permite diferenciar de possíveis reações cruzadas, como algas por exemplo, sendo que são raros os falsos positivos (Chalmers & Katzer, 2013; Scorza & Tangtrongsup, 2010). É muito útil para o exame de múltiplas amostras (Garcia *et al.*, 1992) e mantém a

sensibilidade após vários ciclos de congelação-descongelação (Morimoto *et al.*, 2001). No entanto, a necessidade de um microscópio de fluorescência e o custo associado representa a principal limitação, tornando-a disponível apenas em laboratórios especializados (ESCCAP, 2011; Tangtrongsup & Scorza, 2010).

Relativamente a *Cryptosporidium* spp., alguns autores (Jex *et al.*, 2008), consideram que a técnica de IFD é influenciada pelo tipo de Ac que usa, pelo que diferentes testes comerciais podem apresentar diferentes resultados; parece que os Acm IgG ligam-se com maior avidéz aos antígenos do oocisto, em comparativamente aos Acm IgM. Por outro lado, é de considerar que pode haver variação na ligação destes Ac a oocistos de diferentes espécies e genótipos e que pode influenciar a intensidade da fluorescência (Jex *et al.*, 2008).

b) Pesquisa de coproantígenos

A pesquisa de coproantígenos pode ser realizada mediante *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou imunocromatografia (IC) (Jex *et al.*, 2008; Rishniw *et al.*, 2010). Estas técnicas apresentam especificidade acima de 89% mas sensibilidade muito variável, entre 43 e 98.5% para *Cryptosporidium* spp. (Khurana *et al.*, 2012; Mekaru *et al.*, 2007; Pereira da Fonseca, 2000; Rimhanem-Finne *et al.*, 2007; Zagloul *et al.*, 2013) e entre 51 e 100% para *Giardia* spp. (Mekaru *et al.*, 2007; Rimhanem-Finne *et al.*, 2007; Rishniw *et al.*, 2010).

A técnica de ELISA é de baixo custo acessível tanto nos laboratórios especializados como nas pequenas clínicas veterinárias, é rápida de realizar, de fácil e objetiva interpretação (Mekaru *et al.*, 2007) e permite, ainda, um diagnóstico de infeções pré-patentes, quando ainda não está ocorrer a excreção dos oocistos (Jex *et al.*, 2008) ou quando o número de oocistos é baixo (ESCCAP, 2011).

Estão disponíveis no mercado diversos kits comerciais, a maioria concebida para a medicina humana, que em virtude da variação antigénica, podem originar falsos negativos e podem ver limitada a sua utilização na medicina veterinária (Chalmers & Katzer, 2013; Mekaru *et al.*, 2007; Rimhanem-Finne *et al.*, 2007); está reconhecido que o uso de testes de pesquisa de coproantígenos para fezes humanas não resulta bem na identificação de, pelo menos, oocistos da espécie *Cryptosporidium felis* (Lappin, 2011). Estão disponíveis testes comerciais que detetam ambos os protozoários; no entanto, parece que os testes comerciais duplos, apresentam menor sensibilidade e especificidade que os testes individuais (Mekaru *et al.*, 2007). Nos animais infetados cronicamente, as concentrações antigénicas podem descer abaixo do limite de deteção dos kits (Pereira da Fonseca, 2000; Rishniw *et al.*, 2010). Embora raramente, podem ocorrer reações falso positivas devido à ligação não específica de outros antígenos fecais (Tangtrongsup & Scorza, 2010) ou devido à persistência da excreção antigénica várias semanas após a eliminação do parasita (Rishniw *et al.*, 2010).

7.2.4. Técnicas moleculares: *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

A amplificação do ácido desoxirribonucleico (ADN) por técnicas moleculares, como a de PCR, permitiu a genotipagem dos parasitas, crucial para a compreensão das suas epidemiologias. Esta técnica permite determinar a espécie e o genótipo de cada amostra.

Alguns dos marcadores genéticos mais utilizados para identificação de *Cryptosporidium* spp. incluem a subunidade do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) nuclear (18S-rRNA), o gene que codifica a proteína de choque térmico de 70KDa (*hsp70*) e os genes que codificam as COWP (Carey, Lee & Trevors, 2004; Jex *et al.*, 2008).

Alguns dos marcadores genéticos mais utilizados para identificação de *Giardia* spp. incluem a subunidade do rRNA (ssu-rRNA) e os genes β -giardina (*bg*), isomerase triose fosfato (*tpi*) e glutamato desidrogenase (*gdh*) (Cacciò & Ryan, 2008).

Como alguns marcadores genéticos apresentam elevada homologia entre genótipos (Cacciò & Ryan, 2008), é possível que a análise de isolados de animais com um marcador indique um genótipo potencialmente zoonótico e que, com outro marcador, o mesmo isolado apareça com genótipo específico não zoonótico, ou o inverso (Armson *et al.*, 2009; Gaydos *et al.*, 2008; Gelanew, Lalle, Hailu, Pozio & Cacciò, 2007). Como tal, é recomendada a genotipagem utilizando vários marcadores (Takumi *et al.*, 2012).

As amostras devem ser frescas ou congeladas (Chalmers & Katzer, 2013; Manser *et al.*, 2013). Esta é uma técnica com elevadas especificidade e sensibilidade e deve ser usada como ferramenta de genotipagem de isolados positivos em outras técnicas de diagnóstico (Tangtrongsup & Scorza, 2010).

As principais desvantagens da técnica incluem a necessidade de equipamento altamente especializado, o treino dos analistas e o elevado custo da análise tornando-a uma técnica impraticável na clínica (ESCCAP, 2011; Vohra *et al.*, 2012).

Os fatores que podem levar à falha da amplificação do ADN incluem: i) a quantidade reduzida de amostra (Verweij *et al.*, 2003); ii) a presença de inibidores de PCR nas fezes, como a bilirrubina, os sais biliares e polissacarídeos complexos, mesmo quando presentes em pequenas concentrações (Morgan *et al.*, 1998; Tangtrongsup & Scorza, 2010); e, iii) a presença de fixadores químicos (Chalmers & Katzer, 2013).

8. Controlo da criptosporidiose

8.1. Terapêutica

Geralmente a infeção resolve-se espontaneamente, sendo que o principal objetivo é interromper a diarreia e repor os fluidos. Estes podem ser administrados por via parental ou oral e, no caso da última via, devem incluir glutamina. A terapêutica de suporte deve ainda

incluir antibioterapia, para controlo de possíveis infeções secundárias (Scorza & Tangtrongsup, 2010), e fármacos espasmolíticos, para controlo da dor (ESCCAP, 2011). Não está registado nenhum fármaco eficaz contra o tratamento de criptosporidiose no cão (ESCCAP, 2011). No entanto, têm sido estudados alguns fármacos, potencialmente interessantes para animais com diarreia e excreção de oocistos persistentes; os protocolos são experimentais e não regulamentados, e as doses devem ser adaptadas ao caso em questão:

a) A azitromicina, um macrólido, foi administrada com sucesso terapêutico em algumas vacas. Nos cães, a sua administração na dose de 10mg/Kg, por via oral (PO, do latim *per os*) uma vez ao dia (SID, do latim *semel in die*) durante um mínimo de dez dias, obteve resultados muito variáveis mas pensa-se que são necessárias algumas semanas de terapêutica para que a diarreia seja totalmente resolvida (Scorza & Tangtrongsup, 2010). Aparentemente é um fármaco de uso seguro em cães e gatos, embora deva ser usada com cautela nos doentes hepáticos e renais, e alguns efeitos secundários mais frequentes incluem alterações gastrointestinais (Ramsey, 2008);

b) A tilosina, um outro macrólido, na dose de 10 a 15mg/Kg PO, duas vezes ao dia (BID, do latim *bis in die*) a três vezes ao dia (TID, do latim *ter in die*) durante 21 dias pode ser benéfica no cão. Apesar de ser ineficaz contra o parasita, apresenta propriedades antibióticas e anti-inflamatórias e podem ajudar na resolução da diarreia. Os efeitos secundários incluem alterações gastrointestinais. Devido ao sabor desagradável, pode não ser tolerada (Scorza & Tangtrongsup, 2010);

c) A paromomicina, um aminoglicosídeo, na dose de 125 a 165mg/Kg PO BID ou SID durante cinco dias, parece reduzir o período pré patente, os sinais clínicos e a excreção de oocistos para níveis indetetáveis, mas desconhece-se se elimina ou não o parasita (Ramirez et al., 2004; Scorza & Tangtrongsup, 2010). Trata-se de um fármaco nefrotóxico e ototóxico e não deve ser administrado em animais com diarreia sanguinolenta. Se o animal responder bem à primeira semana de terapêutica e se não forem observados sinais de toxicidade, aquela deve ser prolongada até uma semana após a resolução da diarreia (Scorza & Tangtrongsup, 2010); e,

d) A nitazoxanida, um fármaco sintético com atividade antiprotozoária (Ramirez et al., 2004) aprovado para tratamento da criptosporidiose no Homem. Tem sido estudada a sua eficácia nos pequenos animais, na dose de 25mg/Kg PO BID durante sete dias no mínimo, e parece apresentar bons resultados na resolução da diarreia. No entanto, não é eficaz na ausência de uma resposta imunitária apropriada e provoca irritação intestinal e vômito com alguma frequência. O seu uso combinado com a azitromicina e a paromomicina parece reduzir significativamente a excreção de oocistos (Scorza & Tangtrongsup, 2010).

8.2. Vacinação

Ainda não foi desenvolvida nenhuma vacina eficaz no tratamento da criptosporidiose. A localização do parasita na célula epitelial parece ser a principal razão do insucesso terapêutico e da incapacidade de formulação de uma vacina eficaz (Ramirez *et al.*, 2004).

Alguns estudos de vacinação experimental em ratos e bezerros demonstraram que, na maioria dos casos, a vacina não eliminava ou, sequer, reduzia a excreção de oocistos; por outro lado, trata-se de uma abordagem ineficaz em animais jovens cujo sistema imunitário é imaturo; a sua aplicação seria interessante em fêmeas gestantes, de forma a produzirem colostro hiperimune que protegesse os cachorros da infecção (Thompson *et al.*, 2008).

8.3. Suplementos nutricionais

Ao animal infetado e com sinais clínicos, deve ser prescrita uma dieta de alta digestibilidade (Scorza & Tangtrongsup, 2010). A suplementação com probióticos e fibras a ratos infetados experimentalmente parece reduzir a excreção de oocistos, no entanto, não são conhecidos efeitos benéficos no cão (Ramirez *et al.*, 2004; Scorza & Tangtrongsup, 2010).

8.4. Medidas sanitárias e prevenção

Na ausência de um fármaco eficaz, as medidas sanitárias representam a principal abordagem para controlar o parasita (Ramirez *et al.*, 2004); estas devem ser rigorosas, especialmente em ambientes com grande densidade animal e onde é difícil eliminar o parasita. Os tratadores que lidam diariamente com os animais devem adotar também rigorosas medidas de higiene de forma a evitar a dispersão do parasita (ESCCAP, 2011; Scorza & Tangtrongsup, 2010).

Os oocistos são resistentes a altas temperaturas e aos desinfetantes mais comuns, como a lixívia; a limpeza e a desinfecção das boxes (piso e paredes) devem ser feitas com soluções à base de amónia concentrada ou de cresóis, ou com limpeza a vapor, para inativar os oocistos. As superfícies devem ser completamente secadas, para reduzir a sobrevivência dos oocistos no ambiente (ESCCAP, 2011; Scorza & Tangtrongsup, 2010). As fezes devem ser removidas diariamente. Os animais diarreicos devem ser separados dos animais com fezes normais (Scorza & Tangtrongsup, 2010). O controlo de pragas, nomeadamente de roedores, deve ser rigorosamente implementado, uma vez que podem representar fontes de infeção.

Deve ser evitado o contacto com alimentos e água contaminados; se necessário, esta deve ser fervida e a dieta deve ser comercial (ESCCAP, 2011; Scorza & Tangtrongsup, 2010).

9. Controlo da giardiose

9.1. Terapêutica

O Centro para a Segurança Alimentar e a Saúde Pública (*The Center for Food Security & Public Health*, 2012) recomenda tratar os animais sintomáticos, para controlar os sinais clínicos. A eliminação da infeção nos animais assintomáticos, por vezes frustrante, torna-se um objetivo secundário e de discutível necessidade (Fiechter *et al.*, 2012; Tangtrongsup & Scorza, 2010). As opções terapêuticas no cão incluem:

a) Metronidazol, na dose de 25mg/Kg PO BID durante cinco dias (ESCCAP, 2011). A eficácia deste fármaco contra a giardiose no cão ronda os 67% (Anderson *et al.*, 2004). Alguns efeitos secundários incluem vômito, sinais neurológicos e de hepatotoxicidade e hematuria. A sua administração deve ser cautelosa nos doentes com insuficiência hepática e no primeiro trimestre de gestação (Ramsey, 2008);

b) Fenbendazol, na dose de 50mg/Kg PO SID durante três a cinco dias, podendo ser repetida se os sintomas ou excreção de quistos persistirem (ESCCAP, 2011); apresenta eficácia acima de 90% (Anderson *et al.*, 2004; Ramsey, 2008), pelo que parece ser o fármaco mais eficaz contra *Giardia* spp. (Chon & Kim, 2005). O fenbendazol é relativamente seguro, mesmo em animais gestantes, e apresenta menos efeitos secundários que o metronidazol; estão descritos no cão alguns casos de hipoplasia da medula óssea (Ramsey, 2008). O seu uso combinado com o metronidazol parece diminuir a diarreia, independentemente da causa, e eliminar parasitas mas a sua eficácia contra *Giardia* spp. é desconhecida (Payne & Artzer, 2009⁶, citado por Fiechter *et al.*, 2012); e,

c) Combinação de 15.0mg/Kg de febantel, 14.4mg/Kg de pamoato de pirantel e 5.0mg/Kg de praziquantel, SID durante três dias (ESCCAP, 2011); a sua eficácia ronda os 92.1% a 99% na interrupção da excreção de quistos, ainda que de forma temporária (Barutzki, Schimmel & Schaper, 2002; Montoya *et al.*, 2008; Bowman *et al.*, 2009).

9.1.1. Alternativas terapêuticas

O albendazol apresenta eficácia semelhante ao fenbendazol (Chon & Kim, 2005) mas não é recomendado devido aos efeitos secundários (Anderson *et al.*, 2004). Alguns estudos experimentais com nitazoxanida (Cedillo-Rivera, Chávez, González-Robles, Tapia & Yépez-Mulia, 2002), azitromicina e ronidazol (Fiechter *et al.*, 2012) obtiveram bons resultados e parecem ser promissores no tratamento de *Giardia* spp.

⁶ Payne, P.A. & Artzer, M. (2009). The biology and control of *Giardia* spp. and *Tritrichomonas foetus*. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39(6), 993–1007.

9.2. Vacinação

A estimulação do sistema imunitário contra o parasita seria fundamental para o combate à infecção, e seria de particular importância nos animais cronicamente infetados, parcialmente tolerantes ao parasita, e nos quais os tratamentos convencionais são ineficazes. No entanto, a criação de uma vacina eficaz no tratamento de giardiose tarda a chegar e a única que havia foi descontinuada em 2009, por se mostrar ineficaz (Fletcher, Stark, Harkness & Ellis, 2012).

9.3. Suplementos nutricionais

A suplementação com fibra (Tangtrongsup & Scorza, 2010) ou outros extratos naturais como a silimarina (Chon & Kim, 2005) podem ser benéficos quando associados à terapêutica.

9.4. Medidas sanitárias e prevenção

O tratamento, por si só, não parece ser suficiente para a eliminação do parasita. As causas do insucesso terapêutico incluem a reinfeção, a coinfeção, a existência de uma doença subjacente desconhecida ou a persistência do agente após o tratamento, por exemplo, devido a resistência ao fármaco, nomeadamente ao metronidazol (ESCCAP, 2011; Payne *et al.*, 2002). Em alguns animais a terapêutica parece ser eficaz, pois deixam de excretar os quistos, mas apenas temporariamente (Bowman *et al.*, 2009). Isto leva a crer que os animais voltam a reinfectar-se quando não são implementadas rigorosas medidas de controlo ambiental, principalmente nos focos endémicos localizados, como os canis (Fiechter *et al.*, 2012). Estas medidas incluem a lavagem dos cães com champô à base de digluconato de clorohexidina e a desinfecção das boxes antes e no final do tratamento, com lixívia (Bowman, 2003), cresóis (Bowman, Lynn, Eberhard & Alcaraz, 2003; Fiechter *et al.*, 2012) ou compostos de amónio quaternário (ESCCAP, 2011). As pessoas que lidam com os animais deve adotar apertadas medidas de higiene, incluindo a troca do calçado de forma a limitar a dispersão dos quistos (Fiechter *et al.*, 2012). Aos novos animais introduzidos no lar ou no canil, devem ser realizados exames parasitológicos e nos animais suspeitos ou positivos deve ser implementada a quarentena como medida de segurança (ESCCAP, 2011). A associar às medidas sanitárias é fundamental reduzir o stress e assegurar o bem estar animal (Papini *et al.*, 2005).

10. Prognóstico

O prognóstico da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. é bom nos animais imunocompetentes; geralmente estes mantêm-se assintomáticos e nos sintomáticos, a infecção tende a ser autolimitante, embora recorrente. Nos animais imunodeprimidos, a infecção pode ser difícil de resolver (Scorza & Tangtrongsup, 2010; Tangtrongsup & Scorza, 2010).

CAPÍTULO III. ESTUDO: PREVALÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. E DE *GIARDIA* SPP. EM CÃES DO DISTRITO DE BRAGANÇA, PORTUGAL

1. Objetivos

Os principais objetivos deste estudo incluíram:

- a) determinar a prevalência dos protozoários com potencial caráter zoonótico, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., numa amostra da população canina do distrito de Bragança, no qual se desconhecem estudos similares;
- b) determinar a prevalência de coinfeções por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.;
- c) avaliar possíveis fatores de risco;
- d) determinar coinfeções com outros parasitas gastrointestinais;
- e) avaliar o risco que estes cães representam para o Homem.

2. Materiais e Métodos

2.1. Área de estudo

A área abrangida pelo estudo limitou-se ao distrito de Bragança, situado no nordeste transmontano. Para a realização deste estudo obteve-se a colaboração de dois canis de recolha oficial, uma associação sem fins lucrativos, duas clínicas veterinárias e alguns proprietários a título individual.

2.1.1. Canis de recolha oficial (CRO)

2.1.1.1. Canil Intermunicipal da Terra Quente Transmontana (CITQT)

O CITQT existe desde 2005 e está instalado junto ao Aterro Sanitário de Urjais em Mirandela, sendo constituído pelo canil propriamente dito e uma unidade anexa de inceneração; fazem parte das atividades deste centro: a recolha e o alojamento animais errantes, provenientes dos concelhos de Alfândega da Fé, Carrazeda de Ansiães, Macedo de Cavaleiros, Mirandela e Vila Flor; a promoção da adoção responsável dos mesmos animais; e, o tratamento de cadáveres de animais de companhia, de aves e de coelhos.

O edifício do canil dispõe de 12 celas destinadas a cães errantes, três celas destinadas a canídeos sob quarentena e ainda espaços destinados ao acondicionamento de gatos. A desparasitação interna é realizada nos animais suscetíveis de adoção: nos cachorros até três meses é administrada, quinzenalmente, uma fórmula de pirantel com febantel; nos cães adultos é administrada, trimestralmente e na altura da adoção, uma fórmula de praziquantel, pirantel e fenbendazol. A desparasitação externa é realizada com tetrametrina em spray, quando necessário e na altura da adoção. Estas instalações são desinfestadas semanalmente e adicionalmente quando necessário.

2.1.1.2. Canil Intermunicipal de Vimioso (CIV)

O CIV existe desde 2010 e está instalado no Parque Industrial de Vimioso; este centro destina-se, entre outras atividades, à recolha e alojamento de animais de companhia errantes, provenientes dos distritos de Bragança, Miranda do Douro, Mogadouro e Vimioso, à promoção da adoção responsável dos mesmos animais, à recolha de cadáveres de animais de companhia e ao alojamento obrigatório de animais de companhia para sequestro ou quarentena. O canil dispõe de 20 celas destinadas a cães errantes e quatro celas destinadas a canídeos sob quarentena. A desparasitação interna é realizada com praziquantel (Caniquantel®) nos animais que permanecem no canil para adoção; estes cães são também desparasitados contra ectoparasitas. Principalmente durante a Primavera e o Verão, são feitas regularmente desinfestações nas instalações do canil.

2.1.2. Canil de abrigo

2.1.2.1. Associação Brigantina de Proteção aos Animais (ABPA)

A associação Brigantina de Proteção aos Animais é uma associação sem fins lucrativos, existente desde 2010, e está instalada no concelho de Bragança. O número de animais assim como os protocolos de desparasitação e desinfestação nesta instituição são desconhecidos.

2.2. Amostragem e conservação

Durante o período de Julho de 2013 a Maio de 2014 foram recolhidas 126 amostras de fezes de cães. Foi realizada uma amostragem de conveniência, em que as amostras foram selecionadas pelo fácil acesso e não por um processo aleatório (de Oliveira, 2014). A recolha foi realizada para dentro de pequenos contentores de plástico esterilizados e cada amostra correspondeu às fezes de um cão diferente e de um dia. Posteriormente, as amostras foram identificadas e caracterizadas segundo o seu local de colheita e a origem, a raça, o sexo, a idade, o peso, a condição corporal e, se presente, a identificação eletrónica do animal (ANEXO IV; esta ficha não foi elaborada pela autora); este processo foi realizado pelo pessoal técnico das instituições envolvidas e pelos proprietários dos animais, sem obedecer a nenhuma regra em particular.

Após a recolha, as fezes foram congeladas e enviadas para o Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa e assim permaneceram até serem analisadas. O período que decorreu desde a recolha das fezes até à congelação das mesmas é desconhecido.

2.3. Métodos

No Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UL, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e, antes da análise parasitológica propriamente dita, foram submetidas a uma avaliação macroscópica; esta consistiu na classificação das fezes quanto à sua consistência (Tabela 4) e na pesquisa de parasitas macroscópicos.

Tabela 4. Escala de classificação da consistência fecal.

Consistência fecal	Características
Moldada	Fezes bem moldadas e ligeiramente húmidas
Semipastosa	Fezes húmidas moldadas
Pastosa	Fezes húmidas mal formadas
Diarreica	Fezes aquosas

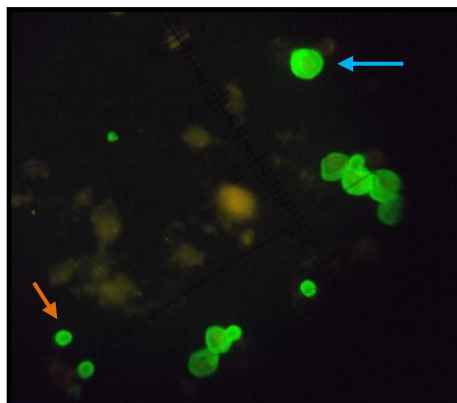
A análise parasitológica propriamente dita consistiu na submissão das amostras fecais a três métodos de diagnóstico laboratorial: IFD, flutuação pelo método de Willis e sedimentação natural.

2.3.1. Pesquisa de coproantigénios pela técnica de imunofluorescência indireta

Esta foi a técnica executada para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. e, para tal, foi escolhido o teste comercial Crypto/Giardia Cel® (Cellabs®). Segundo as indicações do fabricante, este é um teste *in vitro* que deteta simultaneamente oocistos de *Cryptosporidium* spp. e quistos de *Giardia* spp. em amostras fecais e ambientais; o reagente de anticorpo monoclonal de rato marcado com fluoresceína liga-se, especificamente, aos oocistos e/ou aos quistos presentes na amostra; os primeiros são observados como estruturas de forma redonda ou oval com 2-6µm e com fluorescência verde clara, enquanto que os quistos apresentam forma elíptica com 8-12µm e fluorescência verde clara (Figura 19). A observação de, no mínimo, um oocisto e/ou quisto pode validar a positividade do teste. A sensibilidade, especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade deste kit são de cerca de 100%; o teste pode ser usado em fezes frescas, conservadas em formalina ou em acetato de sódio - ácido acético - formalina (SAF), sendo que amostras tratadas com outros fixadores ainda não foram testadas. O teste, de acordo com as instruções do fabricante, não apresenta reações cruzadas com: larvas de *Strongyloides stercoralis*; ovos de *Enterobius vermicularis*, de *Opisthorchis viverrini*, de ancilostomatídeos, de *Trichuris trichiura* e de *Hymenolepis nana*; quistos de *Blastocystis hominis*, de *Entamoeba coli*, de *Endolimax nana* e de *Entamoeba hartmanni*; *Eimeria tenella*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas hominis*, *Cystoisospora belli*, *Microsporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Candida* sp., *Aspergillus* sp.,

Listeria sp., *Legionella* sp., *Erysipelothrix* sp., *Escherichia* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Bronchothrix* sp. e *Corynebacterium* sp.

Figura 19. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. (seta a laranja) e quistos de *Giardia* spp. (seta a azul) em lâmina de controlo positivo, 400x. Fonte original.

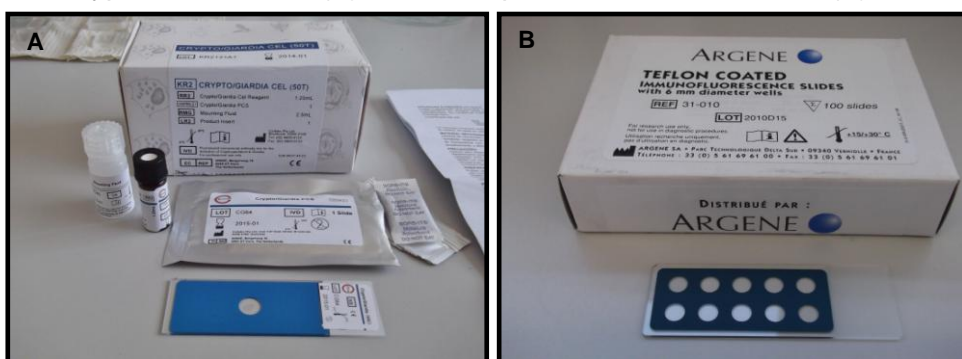


O kit Crypto/Giardia Cel[®] é composto pelo reagente Crypto/Giardia Cel (RR2) que contém o anticorpo monoclonal marcado, pelo meio de montagem (RGM) e por uma lâmina de controlo positivo de uma utilização (CONTROL+); estes materiais estão prontos a usar e devem ser conservados entre 2 e 8°C. Um kit é suficiente para realizar cerca de 50 análises (Figura 20A).

Não estando incluídas no kit, foram utilizadas lâminas Argene[®] (BioMérieux[®]) compostas, cada uma, por 10 poços de 6mm de diâmetro (Figura 20B).

Os restantes materiais necessários à execução da técnica de IFD incluíram: tubo de Knott e suporte, um agitador vortex, uma pipeta de precisão para medição até 25µl e ponteiros, uma câmara húmida, acetona, tampão fosfato-salino (PBS), lamelas de 24x50mm para cobrir a lâmina para uso de imunofluorescência e o microscópio de fluorescência com filtro com comprimento de onda de 450 µm.

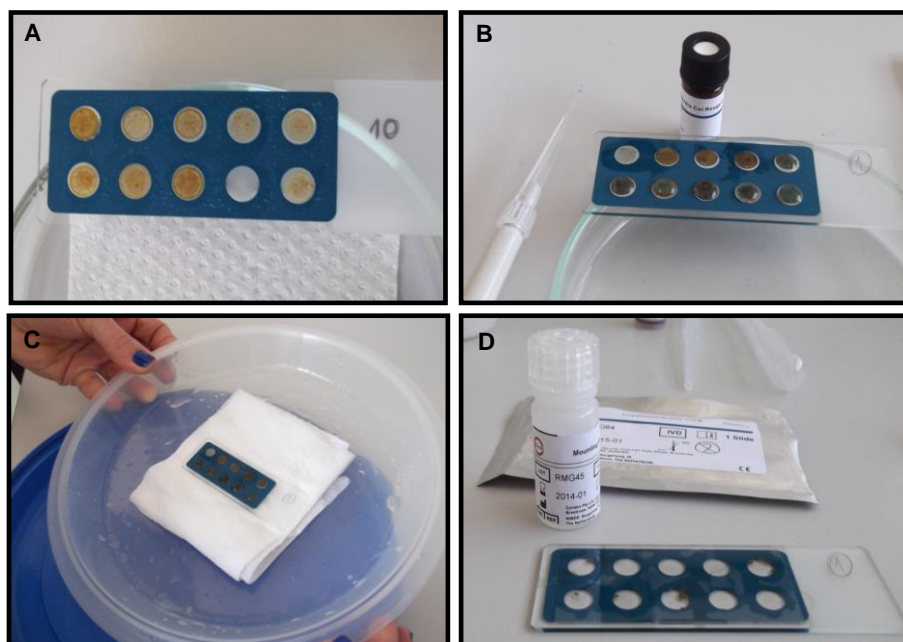
Figura 20. Kit Crypto/Giardia Cel[®] (A) e lâminas para imunofluorescência (B). Fonte original.



O procedimento foi efetuado consoante as instruções do fabricante:

- a) num tubo de Knott, diluiu-se uma pequena porção da amostra, o equivalente a uma ervilha, em 1ml de PBS e homogeneizou-se a mistura;
- b) colocaram-se 20µl da solução anterior num poço da lâmina para uso de imunofluorescência e repetiu-se este procedimento para cada amostra, trocando de ponteira entre cada uma, até se completarem todos os poços;
- c) deixou-se a lâmina ao ar até secar completamente (Figura 21A), fixou-se durante cinco minutos em acetona e deixou-se secar novamente;
- d) adicionaram-se 25µl do reagente RR2 a cada amostra da lâmina em estudo (Figura 21B) e à amostra da lâmina CONTROL+, abrangendo bem toda a área;
- e) incubaram-se as lâminas a 37°C em câmara húmida durante 30 minutos (Figura 21C); neste passo é importante não deixar secar as lâminas ou poderão ocorrer ligações não específicas;
- f) após a saída da estufa, passaram-se as lâminas por uma lavagem com PBS, durante um minuto e removeu-se cuidadosamente a humidade em torno dos poços com papel absorvente;
- g) adicionou-se uma gota de RGM a cada poço e cobriram-se as lâminas com lamela, sem bolhas de ar (Figura 21D); as lâminas foram analisadas de imediato ao microscópio de fluorescência com comprimento de onda de 450 µm, com ampliação de 400x.

Figura 21. Execução da técnica de IFD com o teste Crypto/Giardia Cel[®]. Fonte original.



Legenda: A, lâmina contendo as amostras fecais; B, adição do reagente RR2; C, incubação em câmara húmida; D, lâmina pronta a observar, após adição do meio de montagem e lamela.

2.3.2. Pesquisa de formas parasitárias pelas técnicas de flutuação pelo método de Willis e de sedimentação natural

Adicionalmente, foram executadas estas técnicas para pesquisa de outros parasitas gastrointestinais. Com o método de flutuação procuraram-se formas parasitárias de menor densidade, como os ovos de nematodes e de cestodes; com o método de sedimentação natural procuraram-se formas parasitárias de maior densidade, que por gravidade se tenham depositado no fundo do recipiente ou formas que, embora de menor densidade, tenham sido arrastadas pelos detritos mais densos.

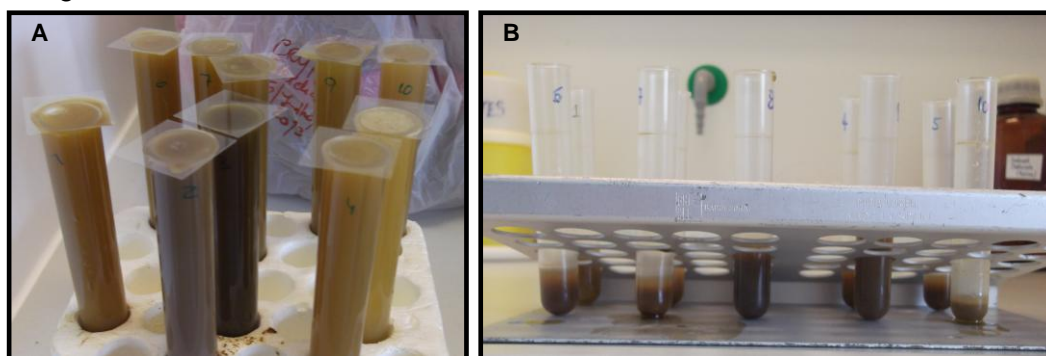
Os materiais necessários à execução destas técnicas incluíram copos de plástico, solução saturada de sacarose, uma vareta de vidro, um passador de rede metálica, um funil de plástico, tubos de ensaio e suporte, lamelas de 24x24 mm, lâminas de vidro, uma pipeta de Pasteur e um microscópio ótico.

As técnicas foram executadas segundo os protocolos do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV:

- a) no copo de plástico homogeneizaram-se cerca de uma a duas gramas de fezes com um pequeno volume de solução saturada de sacarose (cerca de meio copo);
- b) filtrou-se a mistura para o tubo de ensaio até criar, no topo, um menisco convexo e aplicou-se de imediato uma lamela deixando repousar durante, pelo menos, 15 minutos; repetiu-se este procedimento para as várias amostras (Figura 22A) de forma a economizar tempo e espaço, com o cuidado de lavar os materiais entre cada utilização;
- c) transpôs-se a lamela para a lâmina de vidro e observou-se ao microscópio ótico com ampliação de 100 a 200x.

A sedimentação foi realizada na sequência da flutuação: após a transposição da lamela foi descartado o sobrenadante (Figura 22B), homogeneizou-se o sedimento e colocou-se uma pequena quantidade numa lâmina, cobriu-se com lamela e observou-se ao microscópio ótico com ampliação de 100 a 200x.

Figura 22. Flutuação pelo método de Willis (A) e sedimento após rejeição do sobrenadante (B). Fonte original.



2.4. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o auxílio do *software* R®, versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012. The R Foundation for Statistical Computing, Áustria. Obtido em <http://www.r-project.org/>). Para o cálculo das prevalências foi utilizada a ferramenta EpiR, considerando um intervalo de confiança de 95% (IC 95%); para a técnica de IFD foram consideradas sensibilidade e especificidade igual a 1, de acordo com as especificações do fabricante e na ausência de estudos que as contrariem; para as técnicas de flutuação e sedimentação passivas foram consideradas sensibilidade e especificidade igual a 1 (Lopes, 2013). A associação entre a prevalência e os fatores de risco foi realizada com recurso à ferramenta Rcmdr, utilizando tabelas de contingência e o teste Qui-quadrado de Pearson (χ^2). Nas situações em que não era aplicável o teste χ^2 (no presente estudo, quando mais de 25% das células apresentavam valor esperado inferior a 5) foi utilizado o teste exato de Fisher (de Oliveira, 2014). Foi considerando um nível de significância (p) de 0,05.

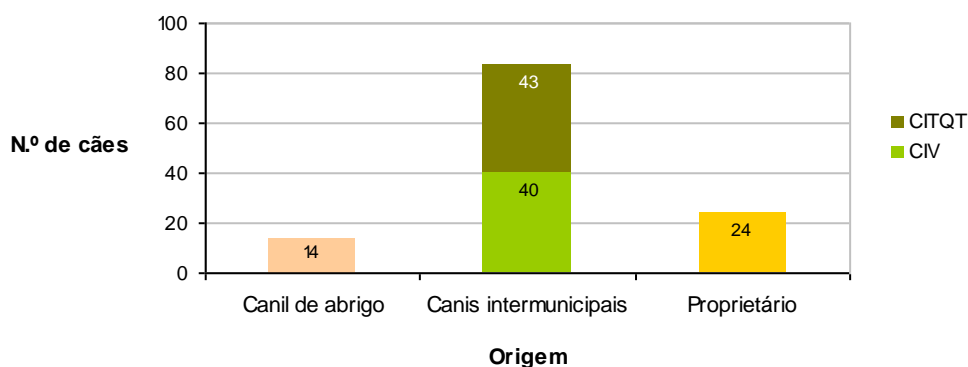
3. Resultados

3.1. Caracterização geral da amostra populacional

Das 126 amostras fecais recebidas no laboratório, cinco não apresentavam ficha de identificação e, por isso, não foram contabilizadas na caracterização da amostra populacional.

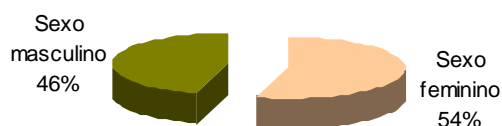
A maioria das amostras fecais era proveniente de cães encontrados nos canis intermunicipais (83/121), sendo que, destes, 48,2% (40/83) encontravam-se no CIV e 51,8% (43/83) encontravam-se no CITQT; Catorze amostras pertenciam a cães encontrados no canil de abrigo e as restantes 24 amostras pertenciam a cães com proprietário (Gráfico 2).

Gráfico 2. Distribuição dos cães consoante a origem (n= 121).



Quanto ao género, fizeram parte da amostra, fezes de 66 fêmeas e 55 machos (Gráfico 3). O estado de esterilização destes cães é desconhecido.

Gráfico 3. Distribuição dos cães consoante o género (n= 121).



A distribuição dos animais consoante a raça encontra-se na tabela 5. A maioria das amostras era proveniente de cães de raça indeterminada (81,0%). A raça encontrada com maior frequência foi a Podengo Português.

Tabela 5. Distribuição dos cães consoante a raça (n= 121).

Raça	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Indeterminada	98	81,0
Pura	23	19,0
Podengo Português	4	3,3
Caniche	3	2,5
Perdigueiro Português	3	2,5
Bulldog Francês	2	1,7
Cocker Spaniel	2	1,7
Epagneul Bretão	2	1,7
Labrador	2	1,7
Braco Alemão	1	0,8
Cão de Serra da Estrela	1	0,8
Dálmata	1	0,8
Pinscher	1	0,8
Yorkshire Terrier	1	0,8

Os animais foram organizados em três categorias etárias (Gráfico 4): i) cães jovens, com idade igual ou inferior a um ano; ii) cães adultos, com idade entre um ano e sete anos; e, iii) cães maduros e idosos, com idade igual ou superior a sete anos. Das 121 fichas de identificação, seis não apresentavam a idade definida e, por isto, as respetivas amostras não foram incluídas neste campo. A maioria dos cães jovens e adultos encontrava-se nos canis intermunicipais (81,0%) e a maioria dos cães maduros e idosos pertenciam a proprietários (53,3%), tal como estão diferenciados na tabela 6.

Gráfico 4. Distribuição dos cães por grupo etário (n= 115).

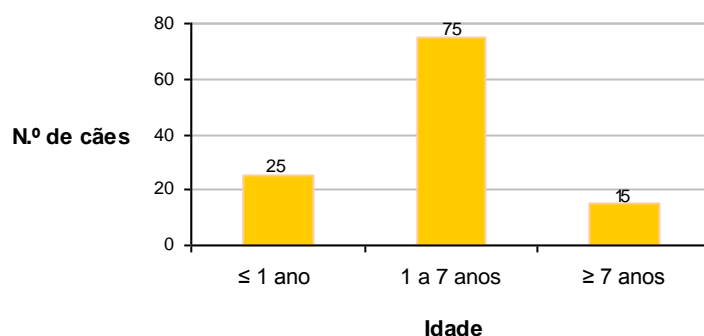


Tabela 6. Distribuição dos cães consoante o grupo etário e a origem (n=115).

Idade	Origem (n.º de cães)			Total	
	Canil de abrigo	Canil intermunicipal	Proprietário		
	≤ 1 ano	1	16	8	25
	1 – 7 anos	2	65	8	75
	≥ 7 anos	5	2	8	15
Total		8 ¹	83	24	115

¹As seis amostras cujas fichas de identificação não apresentavam idade definida pertenciam ao canil de abrigo.

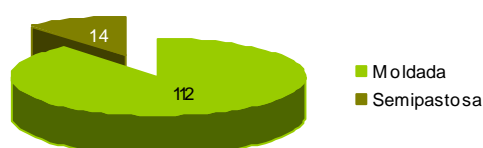
Relativamente à condição corporal, a maioria dos cães (116/121) foi caracterizada como detentora de boa condição corporal. Três cães apresentavam excesso de peso e apenas dois apresentavam magreza evidente.

3.2. Avaliação macroscópica das fezes

A avaliação macroscópica foi realizada à totalidade das amostras fecais (n=126).

A classificação das fezes quanto à consistência fecal (Gráfico 5) revelou a ausência de fezes pastosas ou diarreicas; a maioria (88,9%) apresentava-se bem moldada e apenas 11,1% das amostras apresentavam consistência semipastosa.

Gráfico 5. Distribuição das amostras fecais consoante a consistência (n=126).



Em uma das amostras (1/126) foi possível observar um espécime adulto de *Toxocara canis* (Figura 23).

Figura 23. Adulto macho de *Toxocara canis* em álcool etílico a 70% (A) e observação à lupa da extremidade anterior (B) e posterior (C). Fonte original.

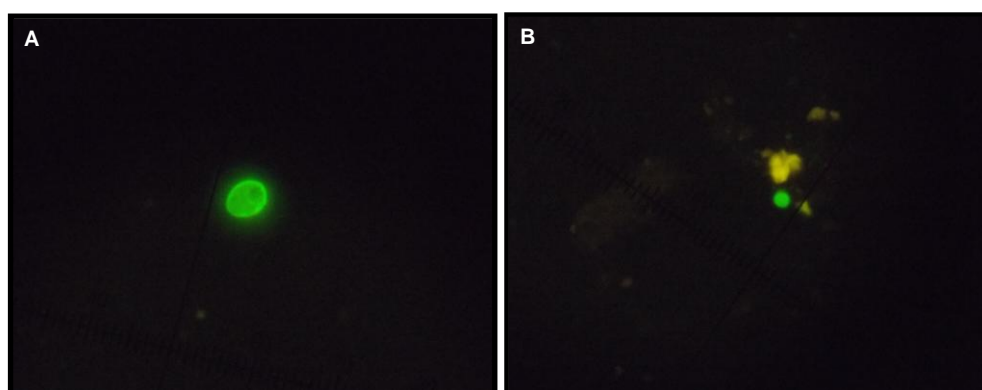


3.3. Análises parasitológicas

3.3.1. Imunofluorescência direta

A validação do teste como positivo a *Cryptosporidium* spp. e/ou a *Giardia* spp. foi realizada através da observação de, pelo menos, um oocisto e/ou quisto (Figura 24).

Figura 24. Amostras submetidas a imunofluorescência direta e positivas a *Giardia* spp. (A) e a *Cryptosporidium* spp. (B), 440x. Fonte original.



3.3.1.1. Prevalência global

A totalidade das 126 amostras foi submetida à técnica da IFD para pesquisa de quistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp; os resultados estão descritos na tabela 7. A prevalência global dos protozoários na amostra populacional foi de 21,4% (27/126). O parasita com maior prevalência foi *Giardia* spp., cujo valor determinado foi de 19,8% (25/126). Em apenas três amostras foram identificados oocistos de *Cryptosporidium* spp., representando uma prevalência de 2,4% (3/126).

Tabela 7. Prevalências de *Cryptosporidium* spp., de *Giardia* spp. e do total na amostra populacional submetida a imunofluorescência direta (n=126).

Parasita	N.º amostras positivas	Prevalência (%)	Intervalo de confiança 95%
<i>Cryptosporidium</i> spp.	3	2,4	0,7 – 7,0
<i>Giardia</i> spp.	25	19,8	13,6 – 27,7
Total ¹	27	21,4	15,0 – 29,7

¹ Amostras positivas a, pelo menos, um dos protozoários.

3.3.1.2. Infecção por *Giardia* spp. e fatores de risco

O estudo da influência dos fatores origem, raça, idade e género na prevalência de *Giardia* spp. está representado na tabela 8.

Tabela 8. Efeito da origem, da raça, do grupo etário e do género na prevalência de *Giardia* spp.

Fator	N.º total de amostras	N.º de amostras positivas	Prevalência % (IC 95%)	Associação estatística
Origem				
Canil de abrigo	14	1	7,1 (0,37-31,7)	p<0,05
Canil intermunicipal	83	22	26,5 (17,9-37,3)	
Proprietário	24	1	4,2 (0,21-20,4)	
Raça				
Indeterminada	98	20	20,4 (13,2-29,5)	p>0,05
Pura	23	4	17,4 (6,2-38,9)	
Grupo etário				
≤ 1 ano	25	3	12,0 (3,4-30,3)	p<0,05
1 – 7 anos	75	20	26,7 (17,8-37,9)	
≥ 7 anos	15	0	0	
Género				
Feminino	66	13	19,7 (11,5-31,0)	p>0,05
Masculino	55	11	20,0 (11,1-32,6)	

Relativamente à origem, a prevalência deste parasita foi de 26,5% nos canis intermunicipais, de 7,1% no canil de abrigo e de 4,2% na amostra de cães de particulares. A maior prevalência nos canis intermunicipais foi estatisticamente significativa ($p=0,02$) relativamente às prevalências no canil de abrigo e nos cães com dono. Quanto ao tipo de canil intermunicipal, a prevalência no CITQT foi de 30,2% (IC 95%=18,4%-45,3%) e no CIV foi de

22,5% (IC 95%=12,2%-38,0%), sendo que esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,43$, $\chi^2=0,64$).

A prevalência do parasita na amostra de cães de raça indeterminada foi de 20,4% e na amostra de cães de raça pura foi de 17,4%. Para a amostra populacional estudada, não foi encontrada associação estatística significativa entre o fator raça e a infecção por *Giardia* spp. ($p=0,74$, $\chi^2=0,11$).

Relativamente ao grupo etário, não foi encontrada nenhuma amostra positiva proveniente de cães maturos ou idosos. A prevalência em cães jovens com um ano ou menos de idade foi de 12,0% e nos cães adultos foi de 26,7%. A idade adulta foi associada de forma estatisticamente significativa à infecção por *Giardia* spp. ($p=0,03$, $\chi^2=6,83$).

Quanto ao género, a diferença entre as prevalências no sexo feminino (19,7%) e a prevalência no sexo masculino (20,0%) não foi significativa ($p=0,97$, $\chi^2=0,002$).

3.3.1.3. Infecção por *Giardia* spp. e sinais clínicos

Os sinais clínicos avaliados neste estudo incluíram a condição corporal e a diminuição da consistência fecal (Tabela 9). Relativamente à condição corporal, apenas um cão positivo a *Giardia* spp. se apresentava magro; os restantes cães positivos apresentavam boa condição corporal, não tendo sido encontrada associação estatística ($p=0,42$). A prevalência do parasita no grupo de animais cujas fezes eram semipastosas foi de 42,9% (19/112) e foi significativamente maior ($p=0,02$, $\chi^2=5,25$) que a prevalência obtida no grupo de animais cujas fezes eram bem moldadas (17%, 6/14).

Tabela 9. Prevalência de *Giardia* spp. consoante a condição corporal (n=121) e a consistência fecal (n=126).

Sinal clínico	N.º total de amostras	N.º de amostras positivas	Prevalência % (IC 95%)	Associação estatística
Condição corporal				
Normal	116	23	19,8 (13,2-28,0)	p>0,05
Excesso peso	3	0	0	
Magreza	2	1	50,0 (2,5-93,7)	
Consistência				
Moldada	112	19	17,0 (11,0-24,9)	p<0,05
Semipastosa	14	6	42,9 (20,6-68,3)	

Na sequência dos resultados anteriores, foi estudada a distribuição das amostras positivas a este protozoário mediante o grupo etário dos cães às quais pertenciam e a respetiva

consistência fecal atribuída (Tabela 10). A maioria dos cães adultos positivos a *Giardia* spp. apresentavam fezes moldadas (16/20); dos três cães jovens positivos a este protozoário, dois apresentavam fezes semipastosas.

Tabela 10. Distribuição das amostras positivas a *Giardia* spp. consoante o grupo etário e a consistência fecal.

Grupo etário	Consistência		Total
		Moldada	
≤ 1 ano	1	2	3
1 – 7 anos	16	4	20
Total	17 ¹	6	23

¹Duas amostras de consistência moldada e positivas a *Giardia* spp. sem idade atribuída.

3.3.1.4. Infecção por *Cryptosporidium* spp. e fatores de risco

O estudo da influência dos fatores origem, raça, idade e género na prevalência de *Cryptosporidium* spp. está representado na tabela 11.

Tabela 11. Efeito da origem, da raça, do grupo etário e do género na prevalência de *Cryptosporidium* spp.

Fator	N.º total de amostras	N.º de amostras positivas	Prevalência % (IC 95%)	Associação estatística
Origem				
Canil de abrigo	14	0	0	p>0,05
Canil intermunicipal	83	3	3,6 (0,9-10,1)	
Privado	24	0	0	
Raça				
Indeterminada	98	3	3,1 (0,8-8,5)	p>0,05
Pura	23	0	0	
Grupo etário				
≤ 1 ano	25	2	8,0 (1,4-25,6)	p>0,05
1 – 7 anos	75	1	1,3 (0,1-7,1)	
≥ 7 anos	15	0	0	
Género				
Feminino	66	2	3,0 (0,5-10,4)	p>0,05
Masculino	55	1	1,8 (0,1-9,7)	

Para a amostra populacional estudada e dado o baixo número de amostras positivas a *Cryptosporidium* spp., não foi encontrada associação estatística significativa entre a infecção por este protozoário e nenhum dos fatores origem ($p=1$), raça ($p=0,55$), grupo etário ($p=0,16$) ou género ($p=1$).

Todas as amostras positivas a este protozoário provinham dos cães intermunicipais, cuja prevalência foi de 3,6%. A prevalência no CITQT foi de 4,7% (IC 95%= 0,8%-15,9%) e no CIV foi de 2,5% (IC 95%= 0,1%-13,3%). A maior prevalência no CITQT não foi estatisticamente significativa, relativamente à obtida no CIV ($p=1$).

A prevalência do parasita na amostra de cães de raça indeterminada foi de 3,1%, não tendo sido encontrado nos cães de raça pura.

Relativamente ao grupo etário, não foi encontrada nenhuma amostra positiva proveniente de animais maduros ou idosos. A prevalência em cães jovens com um ano ou menos de idade foi de 8,0% e nos cães adultos foi de 1,3%.

Quanto ao género, a prevalência no sexo feminino foi de 3,0%, um pouco superior à encontrada no sexo masculino 1,8%.

3.3.1.5. Infecção por *Cryptosporidium* spp. e sinais clínicos

Todos os cães positivos a este parasita apresentavam boa condição corporal (Tabela 12). A prevalência do parasita nas amostras de consistência moldada foi de 1,8% enquanto naquelas de consistência semipastosa foi de 7,1%. Para a amostra populacional estudada, não foi encontrada associação estatística significativa entre a infecção por *Cryptosporidium* spp. e a condição corporal ($p=1$) ou a consistência fecal ($p=0,30$).

Tabela 12. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. consoante a condição corporal (n=121) e a consistência fecal (n=126).

Sinal clínico	N.º total de amostras	N.º de amostras positivas	Prevalência % (IC 95%)	Associação estatística
Condição corporal				
Normal	116	3	2,6 (0,7-7,6)	p>0,05
Excesso peso	3	0	0	
Magreza	2	0	0	
Consistência				
Moldada	112	2	1,8 (0,3-6,5)	p>0,05
Semipastosa	14	1	7,1 (0,4-31,7)	

3.3.2. Flutuação e sedimentação passivas

Das 126 amostras, uma (proveniente do canil de abrigo) apresentava quantidade insuficiente para executar estas duas técnicas. A prevalência global de parasitas obtidos por flutuação e sedimentação foi de 27,2% (34/125). No total, foram identificados helmintes dos géneros *Toxocara*, *Trichuris* e *Fasciola* e helmintes das famílias Ancylostomatidae e Taenidae, cujos géneros não foram identificados (Figura 25), e os mais prevalentes pertenciam ao género *Trichuris* e à família Ancylostomatidae (Tabela 13). Em uma amostra foi observado um ovo de *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) (Figura 25F).

Por se achar importante foi realizado o estudo da associação dos parasitas helmintes à presença de sinais clínicos (Tabela 14); os resultados demonstram a ausência de associação significativa ($p=0,45$, $\chi^2=0,58$).

Relativamente à influência dos fatores origem, raça, grupo etário e género, foi obtida uma maior prevalência estatisticamente significativa de helmintes no canil de abrigo e nas fêmeas (ANEXO V).

Figura 25. Exemplares dos ovos encontrados pelas técnicas de flutuação (A-E, fonte original) e sedimentação (F, fonte original cedida por Dra. Lídia Gomes).

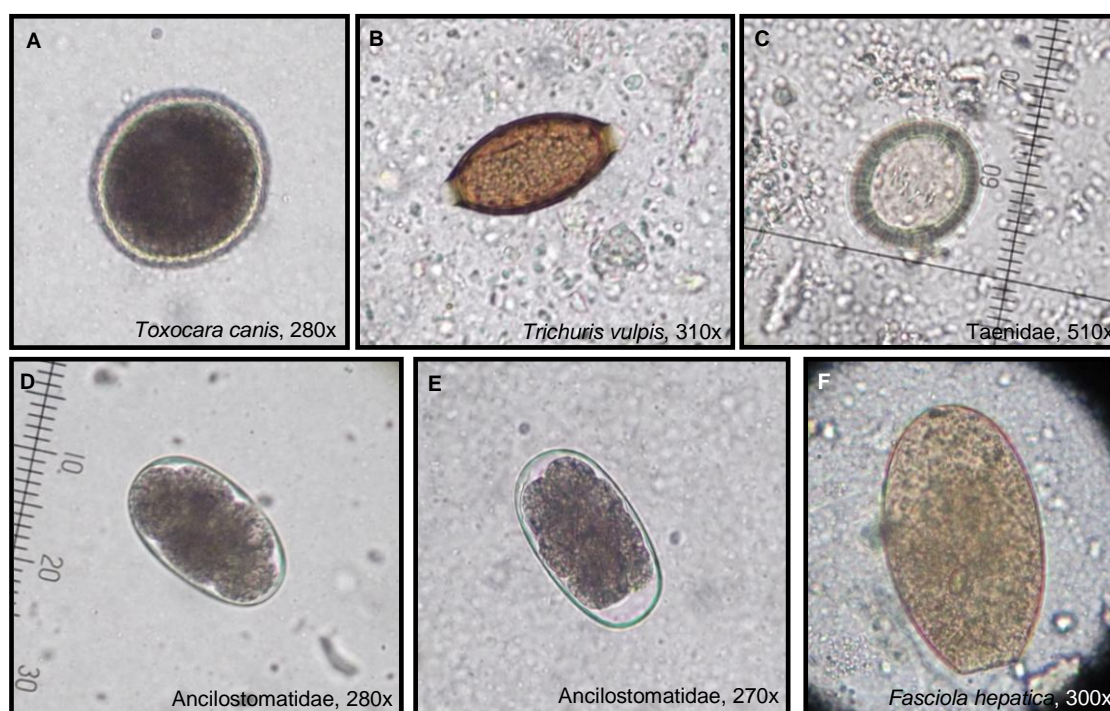


Tabela 13. Prevalências dos parasitas intestinais encontrados na amostra populacional submetida a flutuação e a sedimentação (n=125).

Parasita	N.º amostras positivas	Prevalência %	IC 95%
<i>Trichuris vulpis</i>	17	13,6	8,4-20,7
Ancylostomatidae	17	13,6	8,4-20,7
<i>Toxocara canis</i>	12	9,6	5,5-16,4
Taenidae	6	4,8	2,1-10,3
<i>Fasciola hepatica</i>	1	0,8	0,4-4,3
Total ¹	34	27,2	19,9-35,7

¹Amostras positivas a, pelo menos, um parasita helminte.

Tabela 14. Prevalência dos parasitas obtidos por flutuação e sedimentação consoante a condição corporal (n=120) e a consistência fecal (n=125).

Sinal clínico	N.º total de amostras	N.º de amostras positivas	Prevalência % (IC 95%)	Associação estatística
Condição corporal				
Normal	115 ¹	33	28,7 (20,8-37,8)	p>0,05
Excesso peso	3	0	0	
Magreza	2	0	0	
Consistência				
Moldada	111 ²	29	26,1 (18,6-35,1)	p>0,05
Semipastosa	14	5	35,7 (15,3-62,9)	

¹Uma amostra, pertencente a um cão de condição corporal normal, não apresentou quantidade aceitável para realização das técnicas de flutuação e de sedimentação.

²Uma amostra, cuja consistência foi classificada como moldada, não apresentou quantidade aceitável para realização das técnicas de flutuação e de sedimentação.

3.3.3. Coinfecções parasitárias

Do total das amostras submetidas às três técnicas parasitárias, 44,0% (55/125) continha pelo menos um parasita (Gráfico 6), representando uma prevalência global de 44,0% (IC 95%=35,5%-52,8%): 33 amostras apresentaram parasitas de um género, 18 amostras apresentaram parasitas de dois géneros diferentes e 4 amostras apresentaram parasitas de três géneros diferentes. A infeção mista mais frequente foi a associação de *Trichuris vulpis* a ancilostomatídeos. Uma amostra continha ambos os protozoários, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Foram, ainda, identificadas seis amostras contendo um dos protozoários e, pelo menos, um nematode (Tabela 15).

Gráfico 6. Distribuição das amostras consoante a ausência ou presença de parasitas e o tipo de infeção encontrada (n=125).

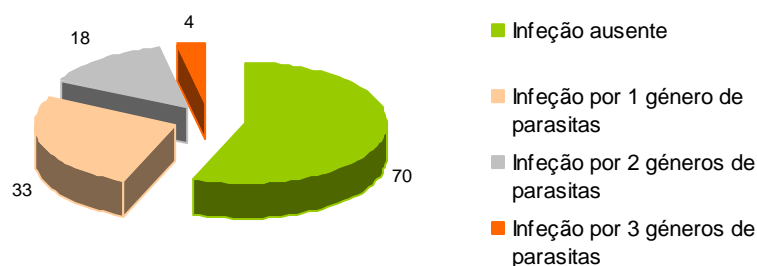


Tabela 15. Frequência absoluta e prevalência das coinfeções parasitárias na amostra populacional (n=125).

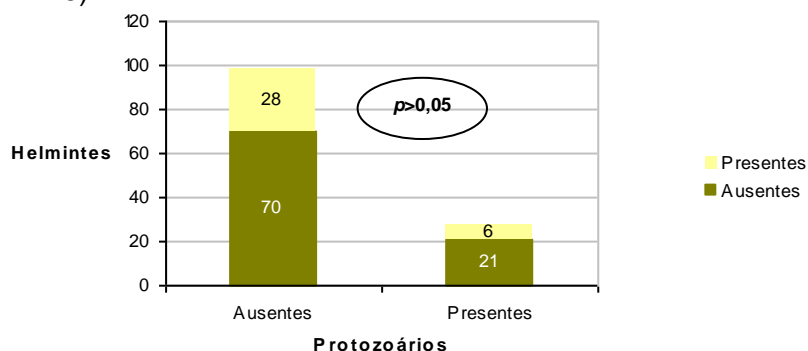
Parasitas	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
Ancylostomatidae + <i>Trichuris vulpis</i>	5	4,0
Ancylostomatidae + Taenidae	3	2,4
<i>Toxocara</i> spp. + <i>Trichuris vulpis</i>	3	2,4
<i>Giardia</i> spp. + Ancylostomatidae + <i>Toxocara canis</i>	2	2,4
<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>Giardia</i> spp.	1	0,8
<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>Trichuris vulpis</i>	1	0,8
<i>Giardia</i> spp. + Ancylostomatidae	1	0,8
<i>Giardia</i> spp. + <i>Toxocara canis</i>	1	0,8
<i>Giardia</i> spp. + <i>Trichuris vulpis</i>	1	0,8
Ancylostomatidae + <i>Toxocara canis</i>	1	0,8
Taenidae + <i>Fasciola hepatica</i>	1	0,8
Ancylostomatidae + <i>Trichuris vulpis</i> + Taenidae	1	0,8
Ancylostomatidae + <i>Toxocara canis</i> + Taenidae	1	0,8

Relativamente à distribuição das amostras positivas a pelo menos um endoparasita consoante a origem, a maioria (98,1%) pertencia a cães dos canis intermunicipais e de abrigo e apenas 1,9% pertencia a cães com proprietário.

3.3.4. Influência da presença de helmintes

Por último, foi estudada a influência da presença de helmintes sobre a presença de protozoários (Gráfico 7).

Gráfico 7. Distribuição das amostras em função da presença e ausência de protozoários e de helmintos (n=125).



Tal como foi referido anteriormente, das 27 amostras positivas a protozoários, 6 foram positivas também a helmintos (Tabela 14). Apesar da associação negativa entre a presença de protozoários e a presença de helmintos (Gráfico 7), esta não foi estatisticamente significativa, para a amostra populacional estudada ($p=0,51$, $\chi^2=0,43$).

4. Discussão

Este é o primeiro estudo conhecido acerca do parasitismo de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. realizado em cães no distrito de Bragança. A ausência de identificação de algumas amostras, representou uma limitação ao estudo. A autora optou por considerar todas as amostras recebidas (n=126) para o cálculo da prevalência global dos protozoários, em vez de excluir do estudo todas as amostras sem identificação ou com identificação insuficiente (n=115); assim, as prevalências obtidas incidem sobre uma amostra populacional maior, mais próxima da prevalência na população.

Teria sido importante a inclusão de amostras fecais de consistência diarreica no presente estudo; no entanto, desconhece-se se tal ocorreu porque os responsáveis pelas colheitas selecionaram apenas animais cujas fezes eram normais ou se não surgiram animais cujas fezes eram diarreicas.

Um dado desconhecido relativamente aos canis em estudo, é a origem da água de bebida, uma vez que esta pode ser uma possibilidade de disseminação dos parasitas e, assim, uma fonte de contaminação para os cães.

A observação dos oocistos/quistos foi relativamente fácil; a sua fluorescência associada à forma característica de cada uma das estruturas permitiu a diferenciação sobre um fundo com alguma fluorescência inespecífica. O kit de IFD usado neste estudo não foi testado pelo fabricante na deteção de oocistos e/ou quistos em amostras conservadas por congelação. Tendo em conta que amostras congeladas apresentarão mais quistos degenerados, é desconhecida a forma em como a *performance* deste teste em particular é afetada; como

tal, não se pode excluir que a sensibilidade do teste, neste estudo, seja inferior a 100% e que as prevalências obtidas serem inferiores às que se obteriam nas mesmas amostras frescas. No entanto, é de considerar que este fator não será significativo, dado que a técnica, usando um teste comercial similar, parece garantir a sua *performance* mesmo em amostras submetidas a vários ciclos de congelação-descongelação (Morimoto *et al.*, 2001). Este facto pode ser igualmente considerado no que diz respeito às técnicas de flutuação e de sedimentação.

A prevalência global de *Giardia* spp. obtida neste estudo foi de 19,8%, o que representa cerca de um quinto da amostra populacional; este resultado está de acordo com o referido por vários autores (Anderson *et al.*, 2004; Carlin *et al.*, 2006; Epe *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Ortuño & Castellà, 2011; Zanzani *et al.*, 2014) em como este é um dos endoparasitas mais prevalentes no cão doméstico. A prevalência obtida é superior à descrita nos países europeus (3% a 7%) pela ESCCAP (2011).

A prevalência global de *Cryptosporidium* spp. (2,4%) ficou aquém das expectativas, mesmo considerando que, com uma confiança de 95%, a prevalência deste parasita na população canina deste distrito possa atingir os 7,0%. Alguns estudos recentes (Dubná *et al.*, 2007; Gracenea, Gómez & Torres, 2009; Silva, 2010; Titilincu, Mircean, Achelaritei & Cozma, 2010) obtiveram prevalências globais muito variáveis no cão, de 2% até 53%, sendo que as prevalências mais baixas foram obtidas por técnicas de diagnóstico descritos como menos sensíveis que a IFD, nomeadamente pela técnica de Ziehl-Neelsen.

A prevalência de *Giardia* spp. foi muito superior à prevalência de *Cryptosporidium* spp. Trata-se de um facto curioso pois, para além das semelhanças epidemiológicas entre ambos, o parasita *Cryptosporidium* spp. apresenta capacidade de autoinfeção, contribuindo para a sua persistência no hospedeiro (Tzipori & Ward, 2002), e parece ser mais resistente no meio ambiente do que o género *Giardia* (Olson, Handley, Ralston, Mcallister & Thompson, 2004). A mesma divergência (com maior ou menor diferença) entre as prevalências destes dois parasitas tem sido obtida em vários estudos (Lebre, 2011; Overgaaauw *et al.*, 2009; Riggio *et al.*, 2013; Santos, 2014) e pode dever-se ao maior período patente de *Giardia* spp. (Santos, 2014), passível de se prolongar durante meses (ESCCAP, 2011), contribuindo para a sua persistência; por outro lado, o género *Cryptosporidium* é um parasita oportunista (Garcia *et al.*, 1983) e, assim, a sua capacidade de infeção está dependente da resposta imunitária do hospedeiro.

4.1. Fatores de risco

Os fatores avaliados neste estudo incluíram a proveniência, a presença ou ausência de raça determinada, a idade e o sexo. O baixo número de amostras positivas a *Cryptosporidium* spp. foi inconclusivo relativamente ao estabelecimento de fatores de risco.

A influência da pertença ou não a uma raça foi inconclusiva, dado que a amostra populacional não era significativa para nenhuma raça em particular e dado não ter sido obtida uma diferença significativa entre as prevalências no grupo de animais de raça indeterminada e no grupo de animais de raça pura. Apesar de Fontanarroza *et al.* (2006) terem obtido uma maior prevalência significativa de *Giardia* spp. em cães de raça pura e de Upjohn *et al.* (2010) terem obtido um maior risco para a infeção, pelo mesmo parasita, em cães da raça Rottweiler, não parece haver necessariamente uma maior predisposição biológica de algumas raças para a infeção (Mohamed, Glickman, Camp, Lund & Moore, 2013). Alguns autores defendem que a análise deste fator deve ser feita em associação com outros como a pertença ou não a um proprietário (Fontanarroza, Vezzani, Basabe & Eiras, 2006) e a atividade desenvolvida pelo cão (atividades como caçadas ou corridas podem promover contacto com fauna silvestre que sirva de reservatório ou maior convívio entre cães que cria a oportunidade de transmissão dos protozoários) (Bajer, Bednarska & Rodo, 2011; Mohamed *et al.*, 2013; Silva, 2010).

Relativamente ao género, as amostras estavam bem distribuídas entre o sexo feminino (54%) e o sexo masculino (46%). A diferença entre as suas prevalências não foi significativa para *Giardia* spp. ou para *Cryptosporidium* spp. Está descrito que os fatores hormonais influenciam a evolução das infeções parasitárias, mas o seu efeito sobre estes dois protozoários especificamente é desconhecido (Bianciardi, Papini, Giuliani & Cardini, 2004). Os autores Bianciardi *et al.* (2004) e Fernandes (2012) encontraram uma associação significativa de *Giardia* spp. ao sexo feminino, que o último autor associou ao comportamento de higienização das fêmeas com as suas crias.

O estado de esterilização dos cães que constituíam a amostra populacional do presente estudo é desconhecido mas seria um fator interessante a analisar. Mohamed *et al.* (2013) e Oliveira-Sequeira *et al.* (2002) encontraram uma maior prevalência significativa de *Giardia* spp. em animais não esterilizados; esta associação pode dever-se a fatores hormonais ou, por outro lado, aos cuidados médico-veterinários: a esterilização pode ser um indicador dos melhores cuidados que os animais possam receber no lar (Mohamed *et al.*, 2013).

Quanto à proveniência dos animais, a maior prevalência obtida nos canis intermunicipais esteve de acordo com o esperado.

Relativamente ao género *Giardia*, a prevalência de 26,5% nos canis intermunicipais aproxima-se da referida por alguns estudos europeus (Miró, Mateo, Montoya, Vela & Calonge, 2007; Scaramozzino *et al.*, 2009) mas foi muito inferior aos cerca de 56% descritos numa outra região de Portugal continental (Lebre, 2011). A região de Bragança é caracterizada pelos rigorosos e prolongados verões e invernos; estas condições podem propiciar à dissecação ou inativação dos quistos e limitar a persistência do agente no meio ambiente (ESCCAP, 2011; Olson *et al.*, 2004) e, talvez por isso, a prevalência obtida nesta região ter sido inferior ao esperado. Por outro lado, teria sido importante a disponibilidade de alguns dados, como o número total de cães na cela e o número total de cães no canil na altura da colheita. Estes dados influenciam a prevalência dos parasitas (nomeadamente de *Giardia* spp.) nas instituições (Papini *et al.*, 2005); considerando que, hipoteticamente, os canis do presente estudo acolham um menor número de cães e um menor número de cães por cela, relativamente ao canil estudado por Lebre (2011), seria de esperar que a prevalência de *Giardia* spp. fosse, assim, inferior à obtida por este autor.

A proveniência do canil intermunicipal foi um fator de risco para a infeção por *Giardia* spp. Este resultado vai de encontro ao descrito na literatura: cães errantes (Martínez-Moreno *et al.*, 2007; Oliveira-Sequeira, Amarante, Ferrari & Nunes, 2002) e cães encontrados em canis municipais e de abrigo (Bugg *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2011; Palmer, Thompson, Traub, Rees & Robertson, 2008; Scaramozzino *et al.*, 2009) apresentam maior risco de infeção por *Giardia* spp.; em causa estão fatores inerentes à sua epidemiologia como o ciclo de vida direto e a excreção de quistos imediatamente infetantes para hospedeiros suscetíveis e muito resistentes no meio ambiente (ESCCAP, 2011). Assim, nos meios de maior densidade animal, de más condições de higiene, de deficiências nutricionais e de maiores níveis de stress (com consequente alteração das reações funcionais e imunológicas intestinais) é potencializada a contaminação ambiental e a consequente dispersão do parasita entre os animais (Papini *et al.*, 2005). No entanto, seria de esperar que também a proveniência do canil de abrigo fosse considerado um fator de risco para a infeção por *Giardia* spp., mas tal não sucedeu. A prevalência encontrada neste canil foi muito inferior à obtida por Ferreira *et al.* (2011) e por Lebre (2011) em canis de abrigo de outras regiões do país (cerca de 60%); em causa podem estar os fatores já referidos, como as condições ambientais características da região, o número de cães por cela e o número de cães na instituição. Relativamente à disparidade obtida entre a prevalência nos canis intermunicipais e a prevalência no canil de abrigo, teria sido importante saber o estado de desparasitação e o tempo de permanência nos canis dos cães que constituíram a amostra, dado que:

a) alguns autores (Bajer *et al.*, 2011; Bugg *et al.*, 1999) obtiveram uma associação significativa entre o aumento da frequência da administração de anti-helmínticos e o aumento da prevalência de protozoários, que os autores Bugg *et al.* (1999) associaram à ocupação, pelos protozoários, do nicho deixado pelos helmintos. Como o estado de desparasitação dos cães deste estudo era desconhecido, foi deduzido indiretamente se os animais teriam recebido ou não um tratamento anti-helmíntico, com base nos resultados das técnicas de flutuação e de sedimentação. De facto, o canil de abrigo foi considerado um fator de risco para a infeção por helmintos (ANEXO V), levando a crer que estes animais não receberam recentemente tratamentos anti-helmínticos. Nos canis intermunicipais, os animais suscetíveis de serem adotados são desparasitados com alguma regularidade, e alguns destes animais podem ter constituído a amostra populacional, dada a menor prevalência de helmintos nestes canis (27,7%). Apesar de não ter sido encontrada associação estatística significativa entre a presença de protozoários e a ausência de helmintos, este facto pode ter exercido influência sobre a prevalência de *Giardia* spp. no canil de abrigo, relativamente aos canis intermunicipais.

b) Scaramozzino *et al.* (2009) obtiveram maior prevalência de *Giardia* spp. num canil que apresentava maior taxa de movimentação (entrada/saída) dos cães. Está descrito que a infeção por *Giardia* spp. é capaz de exortar algum grau de imunidade humoral (Thompson, 2004). Assim, a maior movimentação de animais pode significar, por um lado, a introdução frequente do parasita no ambiente de canil e, por outro lado, pode significar a ausência de resposta a longo prazo que promova alguma resistência à infeção. O conhecimento do tempo de permanência dos animais no canil, não só seria útil para determinar a fonte da infeção (rua *versus* canil) como para determinar qual é o ritmo de movimentação dos animais (abrigo *versus* intermunicipais) e se este poderia ter influenciado as prevalências obtidas.

A prevalência de 4,2% obtida na amostra de cães com proprietário aproxima-se dos 1,3% obtidos por Ferreira *et al.* (2011) em Portugal, um valor inferior ao descrito (20-25%) em outros países europeus (Bianciardi *et al.*, 2004; Epe *et al.*, 2010; Zanzani *et al.*, 2014). A menor prevalência obtida na amostra de cães desta origem esteve de acordo com o esperado, tendo em conta o ambiente de menor densidade animal e de melhores condições sanitárias em que, à partida, estes cães vivem, comparativamente aos cães nos canis de abrigo e intermunicipais. A maioria destas amostras foram recolhidas em colaboração com duas clínicas veterinárias, levando a crer que estes cães recebem cuidados médico-veterinários, com maior ou menor regularidade. Teria sido interessante conhecer alguns dados que parecem influenciar a prevalência, pelo menos, do género *Giardia* na população canina com proprietário: i) número de cães no lar (Bugg *et al.*, 1999);

ii) proveniência do cão (rua, adoção, criador ou conhecido) (Epe *et al.*, 2010); iii) condições de acesso à rua e de contacto com outros animais; e, iv) estado de desparasitação (Bajer *et al.*, 2011).

Relativamente ao género *Cryptosporidium*, as três amostras positivas provinham dos canis intermunicipais; este resultado é compatível com a epidemiologia deste protozoário, como o ciclo de vida direto e a excreção de oocistos infetantes e muito resistentes (ESCCAP, 2011), à semelhança do género *Giardia*. A prevalência nos canis intermunicipais foi um pouco inferior àquela descrita por Lebre em 2011 (6,3%); a ausência de amostras positivas no canil de abrigo ficou muito aquém das expectativas, comparativamente à obtida pelo mesmo autor em canis de abrigo (acima de 13,8%). Em causa poderão estar os fatores ambientais característicos da região de Bragança, a influência da presença de helmintes, o número de cães por cela e o número de cães nos canis na altura da colheita das amostras, à semelhança do que foi referido para o género *Giardia* spp. A ausência de amostras positivas a *Cryptosporidium* spp., provenientes de cães com proprietário, está de acordo com o estudo de Riggio *et al.* (2013) em Itália, no entanto, estão descritos valores superiores a 8% em outros países europeus (Gracenea *et al.*, 2009; Overgaauw *et al.*, 2009).

A prevalência de *Giardia* spp. nos animais adultos com menos de 7 anos foi significativamente superior à encontrada nos outros grupos etários. A idade tem sido identificada como um fator de risco, mas não de forma consensual; está descrito que animais jovens (Bugg *et al.*, 1999; Epe *et al.*, 2010; Fontanarrosa *et al.*, 2006; Gates & Nolan, 2009; Mohamed *et al.*, 2013; Papini *et al.*, 2005; Zanzani *et al.*, 2014) e animais idosos com mais de 15 anos (Gates & Nolan, 2009) apresentam maior risco de infeção por *Giardia* spp., devido à imaturidade do sistema imunitário (Oliveira-Sequeira *et al.*, 2002) ou devido ao comprometimento do sistema imunitário (Bianciardi *et al.*, 2004) e perda das respostas amnésicas resultantes de exposições anteriores ao parasita (Gates & Nolan, 2009); por outro lado, alguns autores (Oliveira-Sequeira *et al.*, 2002), obtiveram prevalências significativamente superiores em cães adultos. A idade adulta identificada como fator de risco para a infeção, neste estudo, pode estar relacionada com o facto da maioria das amostras de cães adultos ser proveniente de canis intermunicipais e assim, estar associada à maior prevalência obtida neste canis e não estar necessariamente associada ao fator idade (Oliveira-Sequeira *et al.*, 2002). No entanto, a maioria das amostras de cães jovens também provinha dos canis intermunicipais e a prevalência foi significativamente menor do que nos cães adultos; neste caso, o tempo de permanência no canil pode ser significativo: animais jovens são tendencialmente adotados com maior frequência, permanecendo menos tempo no canil e, assim, menos expostos ao parasita. A maioria dos animais maduros e

idosos pertenciam a proprietários (8/15) ou encontravam-se no canil de abrigo (5/15); talvez devido a este facto (e não necessariamente devido à idade) não foram encontradas amostras positivas a *Giardia* spp. neste grupo etário.

É de salientar que este grupo etário (1 a 7 anos) era constituído por um número muito superior de cães, relativamente aos restantes grupos etários e, assim, este facto pode ter influenciado este resultado.

Relativamente ao género *Cryptosporidium*, está descrito na literatura que os animais jovens são mais frequentemente infetados por *Cryptosporidium* spp. (Bowman & Lucio-Forster, 2010), à semelhança do referido para o género *Giardia*. Efetivamente, duas das três amostras positivas a *Cryptosporidium* spp. pertenciam a cães jovens, sem no entanto ter sido possível associar a idade à infeção por este parasita.

4.2. Sinais clínicos

Geralmente, a infeção pelos géneros *Giardia* e *Cryptosporidium* mantém-se assintomática ou é autolimitante nos animais imunocompetentes; a diarreia, como principal sintoma, está associada a cachorros ou cães imunodeprimidos (ESCCAP, 2011; Scorza & Tangtrongsup, 2010; Tangtrongsup & Scorza, 2010). Deste estudo não fizeram parte fezes pastosas ou diarreicas; as fezes cuja consistência fecal era diminuída (fezes semipastosas) estavam associadas de forma estatisticamente significativa à maior prevalência de *Giardia* spp., relativamente às fezes bem moldadas; apesar da consistência fecal semipastosa não estar descrita como sintoma na infeção por *Giardia* spp. (e sim, fezes diarreicas propriamente ditas), este resultado pode estar relacionado com o referido por alguns autores (Carlin *et al.*, 2006; Epe *et al.*, 2010; Scaramozzino *et al.*, 2009) em como a infeção por este protozoário poder ser uma causa comum de diminuição da consistência fecal no cão. Esta associação não foi encontrada nas amostras positivas ao género *Cryptosporidium* nem nas amostras positivas a helmintes intestinais, mas a influência de outros fatores não estudados, como a alimentação e a existência de doenças crónicas ou outras infeções subjacentes, na diminuição da consistência fecal desta amostra é desconhecida.

A maioria das amostras positivas a *Giardia* spp. nos cães adultos apresentavam consistência moldada (16/20) e a maioria das amostras positivas ao mesmo parasita nos cães jovens apresentavam fezes semipastosas (2/3); apesar do baixo número de amostras positivas nos cães jovens não permitir estabelecer uma associação, este resultado é coerente com o facto de, nestes animais jovens, a infeção estar mais frequentemente associada à apresentação de sinais clínicos.

Com a exceção de um, todos os cães positivos a um dos protozoários apresentava boa condição corporal. Na literatura, é referido que nos animais infetados, que apresentam

diarreia crônica, a perda de peso pode ser evidente (ESCCAP, 2011; Morgan *et al.*, 2000); a exceção referida acima trata-se de um cão com um ano de idade, proveniente do canil CITQT, positivo a *Giardia* spp. e que apresentava baixa condição corporal e fezes semipastosas; para além da persistência deste agente num animal tão jovem, podem estar em causa outros fatores não estudados, como deficiências nutricionais ou doenças subjacentes.

4.3. Coinfecções parasitárias

A prevalência total de endoparasitas obtida neste estudo (44,0%) aproximou-se da prevalência de 39,2% obtida por Ferreira *et al.* (2011), numa outra região do país. A infeção por um género de parasita foi a mais frequente, seguindo-se a infeção por dois géneros diferentes e uma pequena porção de amostras foram positivas a três géneros de parasitas, um resultado consensual com outros estudos (Ferreira *et al.*, 2011; Lebre, 2011). A elevada prevalência de endoparasitas intestinais obtida nos canis está de acordo com as expectativas, tendo em conta maior densidade animal e onde a dispersão de parasitas tende a ser maior; a baixa prevalência de endoparasitas nos cães com proprietário está de acordo com a menor densidade animal, menos stress, os melhores cuidados que recebem no lar e o acesso a cuidados médico-veterinários mais ou menos regulares, incluindo a desparasitação interna (Ferreira *et al.*, 2011), tendo em conta que a maioria destas amostras foram recolhidas em colaboração com clínicas veterinárias, tal como foi referido anteriormente.

O único caso de coinfeção por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. encontrado neste estudo leva a crer que a infeção simultânea por ambos os protozoários não é frequente, em conformidade com os resultados obtidos por Lebre (2011) e por Santos (2014), em outras regiões do país.

A coinfeção de um protozoário com pelo menos um helminte parece ocorrer de forma pouco frequente, possivelmente em virtude da desparasitação de alguns cães [a prevalência de 4,8% foi superior à obtida por Ferreira *et al.* em 2011 em cães com proprietário (cerca de 1%), inferior à obtida pelo mesmo autor no mesmo estudo em cães de abrigo (cerca de 10%) e foi muito inferior à obtida por Santos em 2014 em cães errantes (cerca de 26%)].

Um estudo de 2007 (Hamnes, Gjerde & Robertson), obteve uma prevalência significativamente maior de helmintes nos cães que estavam infetados simultaneamente com *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.; esta não foi uma realidade neste estudo, pois a amostra infetada com *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foi negativa a outros parasitas pelas técnicas de flutuação e sedimentação.

4.4. Infecção por helmintes

A prevalência global de helmintes neste estudo foi de 27,2%. Os helmintes encontrados neste estudo pertenciam a cinco famílias diferentes: Ancylostomatidae, Trichuridae, Ascarididae, Taeniidae e Fasciolidae, sendo que os mais prevalentes foram ancilostomatídeos, *Trichuris* spp. e *Toxocara* spp.; estes helmintes têm sido encontrados com frequência em outros estudos no país (Ferreira *et al.*, 2011; Lebre, 2011; Santos, 2014) e partilham algumas características biológicas e epidemiológicas, que contribuem para a sua maior prevalência: i) distribuição cosmopolita; ii) ciclo de vida direto; e, iii) infecção assintomática, dificultando a deteção, isolamento e tratamento dos animais positivos, levando à contaminação ambiental e dispersão da infecção entre cães, potenciada nos ambientes de maior densidade animal. A transmissão de ancilostomatídeos e de *Toxocara* spp. pode, ainda, ser difundida pelo contacto com hospedeiro paraténicos, como os roedores. Relativamente à família Taeniidae, a menor prevalência obtida pode estar relacionada com o seu ciclo de vida indireto e a necessidade de um hospedeiro intermediário para completar o ciclo de vida (ESCCAP, 2010).

Tal como foi referido anteriormente, foi encontrada uma maior prevalência significativa no canil de abrigo; este valor (76,9%) foi superior ao obtido por Santos (2014) em cães errantes (cerca de 66%), possivelmente refletindo a ausente ou insuficiente administração de anti-helmínticos e a contenção dos cães num ambiente de maior densidade animal. Também nas fêmeas foi obtida uma maior prevalência significativa; está descrito na literatura, já referido anteriormente, que os fatores hormonais podem influenciar a evolução das infeções parasitárias (Bianciardi *et al.*, 2004). Apesar das condições hormonais destas fêmeas serem desconhecidas, este facto pode ter influenciado a prevalência neste género.

A amostra na qual foi encontrado o ovo de *F. hepatica*, foi identificada como pertencente a um cruzado de Cão de Gado Transmontano; a raça propriamente dita é originária de Trás-os-Montes e é utilizada como guarda e proteção de rebanhos. A espécie *F. hepatica* é um parasita de ciclo de vida indireto: o hospedeiro definitivo é um vertebrado, sendo as espécies mais importantes os ovinos e os bovinos, e o hospedeiro intermediário um molusco (na Europa, o caracol do género *Lymnaea*). A forma infetante são as metacercárias encontradas na vegetação. Está descrito na literatura que a maioria dos mamíferos podem agir como reservatórios da infecção (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn & Jennings, 1996); assim, é possível que este cão se tenha infetado acidentalmente, no pasto contaminado pelos animais em pastoreio e na presença do hospedeiro intermediário.

4.5. Importância zoonótica

Apesar de reconhecido o potencial, em nenhum dos géneros foi comprovada a transmissão zoonótica do cão para o Homem. A infeção por *Cryptosporidium* spp. no cão está associada principalmente à espécie *C. canis* (Huber *et al.*, 2007; Palmer *et al.*, 2008; Thomaz *et al.*, 2007); esta espécie está descrita como sendo rara no Homem e estes casos estão associados a transmissão antroponótica (Lucio-Forster *et al.*, 2010). A infeção por *Giardia* spp. no cão está associada não só aos *assemblages* caninos C e D, como também aos *assemblages* A e B (os mais frequentes no Homem). Alguns autores (Anuar *et al.*, 2014; Upjohn *et al.*, 2010) defendem que existem dois ciclos de transmissão no cão, um envolvendo os *assemblages* caninos, adaptados à espécie, e que é favorecido pelo contacto intensivo entre o grande número de animais a viver juntos, predominando no seu hospedeiro, resultado da exclusão competitiva com outros *assemblages*; e um segundo ciclo que envolve a transmissão cruzada com *assemblages* do Homem, onde a frequência de transmissão cão-cão ocorrerá de forma menos frequente e as infeções pelo *assemblage* A (principalmente) tendem a persistir.

Estes cães não parecem representar um risco para humanos imunocompetentes relativamente ao género *Cryptosporidium*, dado o seu carácter oportunista, a sua baixa prevalência e a diferença de espécies.

Relativamente ao género *Giardia*, teria sido importante fazer a análise molecular para identificação do(s) *assemblage(s)*. Segundo a especulação de Anuar *et al.* (2014) e Upjohn *et al.* (2010), estes animais também não serão um risco para o Homem, tendo em conta que a maior prevalência foi obtida nos canis intermunicipais e, assim, serão os *assemblages* caninos a predominar; no entanto, a existência de estudos (Overgaauw *et al.*, 2009; Scaramozzino *et al.*, 2009; Zanzani *et al.*, 2014) que refutam a hipótese anterior, exige precaução, nomeadamente às pessoas mais expostas e que contactam mais intensivamente com os cães, como a equipa técnica que trabalha nos canis.

5. Conclusão

O principal objetivo deste estudo consistiu na determinação da prevalência dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., numa amostra, o mais alargada possível, da população canina do distrito de Bragança. Apesar da amostra final em estudo ter sido inferior ao inicialmente desejado, foi possível retirar algumas ilações:

- as prevalências entre ambos os protozoários foram bem distintas;
- a infeção por *Cryptosporidium* spp. parece ser baixa nos cães desta região; o baixo número de casos positivos não permitiu estabelecer associações a fatores ou a sinais clínicos;
- a prevalência de *Giardia* spp., obtida neste estudo, foi de cerca de 19%; trata-se de um valor inferior ao esperado mas, ainda assim, importante. A proveniência de canis intermunicipais e o grupo etário entre um e sete anos foram identificados como fatores de risco para a infeção por *Giardia* spp. O grupo de cães cuja consistência fecal era semipastosa apresentou uma maior prevalência significativa, relativamente aquele cujas fezes eram normais; ainda que não tenham sido incluídas neste estudo fezes pastosas ou diarreicas nem tenham sido excluídas outras causas, este parasita pode representar uma causa frequente da diminuição da consistência fecal;
- a coinfeção por ambos os protozoários parece ser pouco frequente;
- a determinação das espécies e/ou *assemblages* não foi passível de ser realizada neste estudo. Admitindo a baixa prevalência obtida, o risco zoonótico que estes cães representam para o Homem, relativamente ao género *Cryptosporidium*, parece ser reduzido. No que diz respeito ao género *Giardia*, o grupo mais exposto tende a ser a equipa técnica que desenvolve atividades nos canis intermunicipais;
- na ausência de informação acerca da origem da infeção para estes cães, admite-se a possibilidade de os mesmos agirem como fonte de contaminação para os parques públicos, até ao momento da captura, e consequente possibilidade de exposição de crianças ou indivíduos imunodeprimidos;
- o teste de imunofluorescência usado neste estudo, para além da elevada sensibilidade assumida pelo fabricante (e, consequentemente, também assumida neste estudo) foi de fácil execução, fácil leitura dos resultados e permitiu rentabilizar muito tempo, uma vez que as amostras foram analisadas em série.

Como base nos resultados obtidos, é importante sensibilizar médicos veterinários, tratadores e proprietários para a importância destes agentes, nomeadamente do género *Giardia*, na população canina. Acerca das instituições envolvidas neste estudo, são desconhecidas quais as medidas de higienização e desinfeção adotadas, pelo que não é

possível determinar se as mesmas são eficazes. Tendo em conta a tendência assintomática que estas infeções assumem e a ausência de uma terapêutica eficaz, torna-se difícil erradicar estes parasitas nos ambientes de maior densidade, sendo da máxima importância a adoção de rigorosas medidas higiénico-sanitárias para o seu controlo e prevenção. Algumas das medidas descritas incluem a realização de análises parasitológicas aos novos animais introduzidos nas instalações, a separação dos animais positivos ou suspeitos, a remoção diária das fezes das jaulas e a adoção de rigorosas medidas higiénicas pelos tratadores. A elevada prevalência nos canis intermunicipais pode representar uma maior exposição não só dos trabalhadores envolvidos nas instituições, como também dos proprietários que adotem estes cães e dos animais que já existam neste lar.

A técnica utilizada neste estudo parece ser adequada para a realização de estudos epidemiológicos similares. De futuro seria interessante estudar a *performance* da técnica em causa antes e após congelação, assim como a comparação com outras técnicas, nomeadamente as técnicas de Ziehl-Neelsen e de flutuação com sulfato de zinco usadas tradicionalmente ou, ainda, com uma técnica de pesquisa de coproantígenos.

Espera-se, com este estudo, contribuir para a compreensão da epidemiologia destes parasitas nos animais domésticos. Futuramente, é importante assegurar a continuidade deste tipo de estudos, idealmente com genotipagem das amostras positivas, pois são uma ferramenta essencial para a compreensão da epidemiologia dos parasitas, para determinação de fatores de risco e do risco zoonótico e, consequentemente, para implementação ou melhoramento das medidas de controlo e prevenção.

BIBLIOGRAFIA

- Adam, R.D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447–475.
- Alles, A.J., Waldron, M.A., Sierra, L.S. & Mattia, A.R. (1995). Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(6), 1632–1634.
- Almeida, A.S., Delgado, M.L., Soares, S.C., Castro, A.O., Moreira, M.J., Mendonça, C.M., Canada, N.B. & Costa, J.M. (2006a). Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(S1), 177–178.
- Almeida, A.S., Delgado, M.L., Soares, S.C., Castro, A.O., Moreira, M.J., Mendonça, C.M., Canada, N.B., Costa, J.M. & Coelho, H.G. (2006b). Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in northern Portugal. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(S1), 26–27.
- Anderson, K.A., Brooks, A.S., Morrison, A.L., Reid-Smith, R.J., Martin, S.W., Benn, D.M. & Peregrine, A.S. (2004). Impact of *Giardia* vaccination on asymptomatic *Giardia* infections in dogs at a research facility. *The Canadian Veterinary Journal*, 45(11), 924–930.
- Anuar, T.S., Azreen, S.N., Salleh, F.M. & Moktar, N. (2014). Molecular epidemiology of giardiasis among Orang Asli in Malaysia: Application of the triosephosphate isomerase gene. *BMC Infectious Diseases*, 14, 78.
- Armson, A., Yang, R., Thompson, J., Johnson, J., Reid, S. & Ryan, U.M. (2009). *Giardia* genotypes in pigs in Western Australia: Prevalence and association with diarrhea. *Experimental Parasitology*, 121, 381–383.
- Bajer, A., Bednarska, M. & Rodo, A. (2011). Risk factors and control of intestinal parasite infections in sled dogs in Poland. *Veterinary Parasitology*, 175, 343–350.
- Barta, J.R. & Thompson, R.C.A. (2006). What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, 22(10), 463–468.
- Barugahare, R., Dennis, M.M., Becker, J.A. & Slapeta, J. (2011). Detection of *Cryptosporidium molnari* oocysts from fish by fluorescent-antibody staining assays for cryptosporidium spp. affecting humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1878–1880.
- Barutzki, D., Schimmel, A. & Schaper, R. (2002). Efficacy of pyrantel embonate, febantel and praziquantel against *Giardia* species in naturally infected adult dogs. Acedido a Jun. 17, 2014, disponível em http://www.labor-barutzki.de/info_efficacy_giardia.pdf.
- BayOPet. (2011). Parasites, protozoa: *Giardia*. Bayer Learning Center. Australia: Bayer. Acedido em Jul. 24, 2014 em <http://bayopetold.spinifexdev.com/?TabId=676>.

- Benchimol, M. (2004). Mitosis in *Giardia lamblia*: multiple modes of cytokinesis. *Protist*, 155, 33–44.
- Bianciardi, P., Papini, R., Giuliani, G. & Cardini, G. (2004). Prevalence of *Giardia* antigen in stool samples. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 155(8-9), 417-421.
- Borad, A. & Ward, H. (2010). Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiology*, 5, 507–519.
- Borowski, H., Clode, P.L. & Thompson, R.C.A. (2008). Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology*, 24(11), 509–516.
- Bouzig, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., & Tyler, K.M. (2013). *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 115–134.
- Bowman, D.D., Liotta, J.L., Ulrich, M., Charles, S.D., Heine, J. & Schaper, R. (2009). Treatment of naturally occurring, asymptomatic *Giardia* sp. in dogs with Drontal Plus flavour tablets. *Parasitology Research*, 105(S1), 125–134.
- Bowman, D.D. & Lucio-Forster, A. (2010). Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. *Experimental Parasitology*, 124, 121–127.
- Bowman, D.D., Lynn, R.C., Eberhard, M.L. & Alcaraz, A. (2003). Protozoans. In *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. (8th ed.). (pp. 88-89). St. Louis, Missouri: Elsevier Science, Saunders.
- Brook, E.J., Christley, R.M., French, N.P. & Hart, C.A. (2008). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces: comparison of three methods. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 26–31.
- Bugg, R.J., Robertson, I.D., Elliot, A.D. & Thompson, R.C.A. (1999). Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. *The Veterinary Journal*, 157(3), 295–301.
- Cacciò, S.M. & Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160(2), 75–80.
- Carey, C.M., Lee, H. & Trevors, J.T. (2004). Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, 38, 818–862.
- Carlin, E.P., Bowman, D.D. & Scarlett, J.M. (2006). Prevalence of *Giardia* in symptomatic dogs and cats in the United States. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 28(11A), 1-12.
- Cavalier-Smith, T. (2003). Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology*, 39, 338–348.

- Cavalier-Smith, T. & Chao, E.E. (2004). Protalveolate phylogeny and systematics and the origins of Sporozoa and dinoflagellates (phylum Myxozoa nom. nov.). *European Journal of Protistology*, 40(3), 185–212.
- Cedillo-Rivera, R., Chávez, B., González-Robles, A., Tapia, A. & Yépez-Mulia, L. (2002). In vitro effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(3), 201–208.
- Chalmers, R.M. & Katzer, F. (2013). Looking for *Cryptosporidium*: The application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology*, 29(5), 237–251.
- Chon, S. & Kim, N. (2005). Evaluation of silymarin in the treatment on asymptomatic *Giardia* infections in dogs. *Parasitology Research*, 97, 445–451.
- de Oliveira, A.G. (2014). Estudos Analíticos. *Bioestatística Descodificada*. (2^a ed.). (pp. 77–114). Lousã: Lidel.
- Deng, M., Rutherford, M.S. & Abrahamsen, M.S. (2004). Host intestinal epithelial response to *Cryptosporidium parvum*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(6), 869–884.
- Dubná, S., Langrová, I., Nápravník, J., Jankovská, I., Vadlejch, J., Pekár, S. & Fechtner, J. (2007). The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 145(1-2), 120–128.
- Edwards, H., Thompson, R.C.A., Koh, W.H. & Clode, P.L. (2012). Labeling surface epitopes to identify *Cryptosporidium* life stages using a scanning electron microscopy-based immunogold approach. *Molecular and Cellular Probes*, 26, 21–28.
- Elliott, D.A. & Clark, D.P. (2000). *Cryptosporidium parvum* induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface. *Infection and Immunity*, 68(4), 2315–2322.
- Elmendorf, H.G., Dawson, S.C. & McCaffery, J.M. (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*, 33, 3–28.
- Epe, C., Rehker, G., Schnieder, T., Lorentzen, L. & Kreienbrock, L. (2010). *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe: Results of a European study. *Veterinary Parasitology*, 173, 32–38.
- Erlandsen, S.L., Macechko, P.T., Keulen, H.V. & Jarrol, E.L. (1996). Formation of the *Giardia* cyst wall: Studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43(5), 416–429.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. (2010). Worm control in dogs and cats. *ESCCAP Guidelines n.º1 Second Edition*, pp.1-28. Worcestershire, UK: ESCCAP.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. (2011). Control of intestinal protozoa in dogs and cats. *ESCCAP Guidelines n.º6 First Edition*, pp.1-24. Worcestershire, UK: ESCCAP.

- Faubert, G. (2000). Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 35–54.
- Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124, 90–97.
- Fayer, R. General Biology. (2008). In R. Fayer & L. Xiao (Eds), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. (2nd ed.). (pp.1-26). Florida, USA: CRC Press. Acedido em Jul. 2, 2014, disponível em http://books.google.pt/books?id=suJZXO2_gK0C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false.
- Fernandes, A.D. (2012). *Parasitismo por Giardia spp. em canis de criação na região de Viseu, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. (pp.29-50). Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Ferreira, F., Pereira-Baltasar, P., Parreira, R., Padre, L., Vilhena, M., Tavira, L., Atouguia, J. & Centeno-Lima, S. (2011). Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 179, 242–245.
- Ferreira, F., Bandeira, R., Constantino, C., Fonseca, A., Gomes, J., Rodrigues, R., Atouguia, J. & Centeno-Lima, S. (2013). Molecular and Clinical Characterization of *Giardia duodenalis* Infection in Preschool Children from Lisbon, Portugal. *Journal of Parasitology Research*, 2013, 1-6. Acedido em Mar. 26, 2015, disponível em <http://dx.doi.org/10.1155/2013/252971>.
- Fiechter, R., Deplazes, P. & Schnyder, M. (2012). Control of *Giardia* infections with ronidazole and intensive hygiene management in a dog kennel. *Veterinary Parasitology*, 187, 93–98.
- Fletcher, S.M., Stark, D., Harkness, J. & Ellis, J. (2012). Enteric protozoa in the developed world: A public health perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 420–449.
- Fontanarrosa, M.F., Vezzani, D., Basabe, J. & Eiras, D.F. (2006). An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): Age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. *Veterinary Parasitology*, 136, 283–295.
- Forney, J.R., DeWald, D., Yang, S., Speer, C.A. & Healey, M.C. (1999). A role for host phosphoinositide 3-Kinase and cytoskeletal remodeling during *Cryptosporidium parvum* infection, 67(2), 844–852.
- Garcia, L.S., Bruckner, D.A., Brewer, T.C. & Shimizu, R.Y. (1983). Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 18, 185–190.
- Garcia, L.S., Shum, A.C. & Bruckner, D.A. (1992). Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(12), 3255–3257.
- Gardner, T.B. & Hill, D.R. (2001). Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 114–128.

- Gates, M.C. & Nolan, T.J. (2009). Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 166, 153–158.
- Gaydos, J.K., Miller, W.A., Johnson, C., Zornetzer, H., Melli, A., Packham, A., Jeffries, S.J., Lance, M.M. & Conrad, P.A. (2008). Novel and canine genotypes of *Giardia duodenalis* in harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*). *The Journal of Parasitology*, 94(6), 1264–1268.
- Gelanew, T., Lalle, M., Hailu, A., Pozio, E. & Cacciò, S.M. (2007). Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Tropica*, 102, 92–99.
- Gracenea, M., Gómez, M.S. & Torres, J. (2009). Prevalence of intestinal parasites in shelter dogs and cats in the metropolitan area of Barcelona (Spain). *Acta Parasitologica*, 54, 73–77.
- Guerden, T., Berkvens, D., Casaert, S., Vercruysse, J. & Claerebout, E. (2008). A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, 157, 14–20.
- Hajdusek, O., Ditrich, O. & Slapeta, J. (2004). Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 122, 183–192.
- Hamnes, I.S., Gjerde, B.K. & Robertson, L.J. (2007). A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(22). Acedido em Mar. 31, 2014, disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2040143&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Havens, P.L. & Davis, J.P. (1996). *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. *Seminars in Pediatric Infectious Disease*, 7(4), 250–257.
- Hewlett, E., Andrews, J.J., Ruffier, J. & Schaefer, F. (1982). Experimental infection of mongrel dogs with *Giardia lamblia* cysts and cultured trophozoites. *Journal of Infectious Disease*, 145(1), 89.
- House, S.A, Richter, D.J., Pham, J.K. & Dawson, S.C. (2011). *Giardia* flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces. *PLoS Pathogens*, 7(8), 1-13. Acedido em Abr. 24, 2014, disponível em <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1002167>.
- Huber, F., Silva, S., Bomfim, T., Teixeira, K. & Bello, A. (2007). Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 150, 65–74.
- Hunter, P.R. & Thompson, R.C.A. (2005). The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 35, 1181–1190.
- Iii, F., Johnson, C., Hsu, C. & Rice, E. (1991). Determination of *Giardia lamblia* cyst infective dose for the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*), 57(8), 2408–2409.

- Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S. & Takada, S. (1989). Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitology Research*, 75, 218–222.
- Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T., Campbell, B.E., & Gasser, R.B. (2008). *Cryptosporidium*: Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, 26(4), 304–317.
- Júlio, C., Vilares, A., Oleastro, M., Ferreira, I., Gomes, S., Monteiro, L., Nunes, B., Tenreiro, R. & Ângelo, H. (2012). Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. *Parasites & Vectors*, 5(22), 1-8. Acedido em Mar. 15, 2014, disponível em <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/22>.
- Karanis, P. & Aldeyarbi, H.M. (2011). Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. *International Journal for Parasitology*, 41, 1231–1242.
- Khurana, S., Sharma, P., Sharma, A. & Malla, N. (2012). Evaluation of Ziehl-Neelsen staining, auramine phenol staining, antigen detection enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction, for the diagnosis of intestinal cryptosporidiosis. *Tropical Parasitology*, 2, 20–23.
- Lappin, M.R. (2011). Diagnosis and treatment of *Cryptosporidium* and *Isospora* in cats. In IVIS, Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA, Jeju, Korea. (pp.868–871). Acedido em Set. 22, 2014, disponível em <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2011/216.pdf>.
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D.M. & Sogin, M.L. (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International Journal for Parasitology*, 40(9), 1063–1074.
- Lebre, F.L. (2011). *Rastreo de parasitas gastrointestinais e seu impacto zoonótico em cães de canil da cidade de Lisboa*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. (pp.71-96). Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Leitch, G.J. & He, Q. (2011). Cryptosporidiosis: An overview. *Journal of Biomedical Research*, 25, 1–16.
- Levine, N.D. (1979). *Giardia lamblia*: Classification, Structure, Identification. In W. Jakubowski & J. Hoff (Eds.), *Waterborne Transmission of Giardiasis: Proceedings of a Symposium* (pp.2–3). US: Environmental Protection Agency. Acedido em Abr. 1, 2014, disponível em http://books.google.pt/books?id=ciEoaOcf0mwC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=grassi+dimorphus+muris&source=bl&ots=8Hg1K_qykl&sig=r-hINlbB0gCz5jgYC9S2eo0iYYc&hl=en&sa=X&ei=rNo6U7XWK6ug7Ab734CoBw&ved=0CC8Q6AEwAQ#v=onepage&q=grassi+dimorphus+muris&f=false.
- Lloyd, D., Harris, J., Maroulis, S., Wadley, R., Ralphs, J., Hann, A., Turner, M. & Edwards, M. (2002). The “primitive” microaerophile *Giardia intestinalis* (syn. *lamblia*, *duodenalis*)

has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating functions. *Microbiology*, 148, 1349–1354.

Lopes, C. (2013). *Estudo dos parasitas gastrointestinais dos sacarrabos (Herpestes ichneumon) e outros carnívoros silvestres coabitantes, com relevância em Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (p.44). Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.

Lucio-Forster, A., Griffiths, J.K., Cama, V.A., Xiao, L. & Bowman, D.D. (2010). Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends in Parasitology*, 26(4), 174–179.

Lupo, P.J., Langer-Curry, R.C., Robinson, M., Okhuysen, P.C. & Chappell, C.L. (2008). *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(6), 917–921.

Manser, M., Granlund, M., Edwards, H., Saez, A., Petersen, E., Evengard, B. & Chiodini, P. (2013). Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in clinical laboratories in Europe: A comparative study. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 65–71.

Martínez-Moreno, F.J., Hernández, S., López-Cobs, E., Becerra, C., Acosta, I. & Martínez-Moreno, A. (2007). Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Veterinary Parasitology*, 143, 7–13.

Mekaru, S.R., Marks, S.L., Felley, A.J., Chouicha, N. & Kass, P.H. (2007). Comparison of direct immunofluorescence, immunoassays, and fecal flotation for detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in naturally exposed cats in 4 Northern California animal shelters. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 959–965.

Mendonça, C., Almeida, A., Castro, A., Delgado, M., Soares, S., Costa, J. & Canada, N. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Veterinary Parasitology*, 147, 47–50.

Midlej, V. & Benchimol, M. (2009). *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur. *Parasitology International*, 58, 72–80.

Miller, D., Liggett, A., Radi, Z. & Branch, L. (2003). Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy. *Veterinary Parasitology*, 115, 199–204.

Mircean, V., Györke, A., Jarca, A., & Cozma, V. (2011). Prevalence of *Giardia* species in stool samples by ELISA in household cats from Romania and risk factors. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 13, 479–482.

Miró, G., Mateo, M., Montoya, A., Vela, E. & Calonge, R. (2007). Survey of intestinal parasites in stray dogs in the Madrid area and comparison of the efficacy of three anthelmintics in naturally infected dogs. *Parasitology Research*, 100, 317–320.

Mohamed, A.S., Glickman, L.T., Camp, J.W., Lund, E., & Moore, G.E. (2013). Prevalence and risk factors for *Giardia* spp. infection in a large national sample of pet dogs visiting veterinary hospitals in the United States (2003-2009). *Veterinary Parasitology*, 195, 35–41.

- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G. & Ey, P.L. (2003). Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infection, Genetics and Evolution*, 3, 29–38.
- Monis, P.T., Cacciò, S.M., & Thompson, R.C.A. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*, 25(2), 93–100.
- Montoya, A., Dado, D., Mateo, M., Espinosa, C. & Miró, G. (2008). Efficacy of Drontal Flavour Plus (50 mg praziquantel, 144 mg pyrantel embonate, 150 mg febantel per tablet) against *Giardia* sp in naturally infected dogs. *Parasitology Research*, 103, 1141–1144.
- Morgan, U.M., Pallant, L., Dwyer, B.W., Forbes, D.A., Rich, G. & Thompson, R.C.A. (1998). Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: Clinical trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 995–998.
- Morgan, U.M., Xiao, L., Monis, P.T., Fall, A., Peter, J., Fayer, R., Denholm, K., Limor, J., Lal, A. & Thompson, R.C.A. (2000). *Cryptosporidium* spp. in domestic dogs: The dog genotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2220–2223.
- Morimoto, N., Komatsu, C., Nishida, M. & Sugiura, T. (2001). Detection of *Giardia lamblia* cysts in non-fixed long-term stored human feces by direct immunofluorescence assay. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 54, 72–74.
- Nash, T.E. (2002). Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Molecular Microbiology*, 45(3), 585–590.
- O'Hara, S., Small, A.J., Chen, X. & Larusso, N.F. (2008). Host Cell Actin Remodeling in Response to *Cryptosporidium*. In B. Burleigh & D. Soldati (Eds.), *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion* (pp. 92–100). Acedido em Ago. 14, 2014, disponível em http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-0-387-78267-6_7.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R. & DuPont, H.L. (1999). Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *The Journal of Infectious Diseases*, 180, 1275–1281.
- Oliveira-Sequeira, T., Amarante, A., Ferrari, T. & Nunes, L. (2002). Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 103, 19–27.
- Olson, M.E., Hannigan, C.J., Gaviller, P.F. & Fulton, L.A. (2001). The use of a *Giardia* vaccine as an immunotherapeutic agent in dogs. *The Canadian Veterinary Journal*, 42, 865–868.
- Ortuño, A. & Castellà, J. (2011). Intestinal parasites in shelter dogs and risk factors associated with the facility and its management. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 66(3), 103–107.
- Overgaauw, P., Zutphen, L., Hoek, D., Yaya, F., Roelfsema, J., Pinelli, E., Knapen, F. & Kortbeek, L. (2009). Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 163, 115–122.

- Palmer, C. S., Thompson, R. C. A., Traub, R. J., Rees, R., & Robertson, I. D. (2008). National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Veterinary Parasitology*, 151, 181–190.
- Palmer, C.S., Traub, R.J., Robertson, I.D., Devlin, G., Rees, R. & Thompson, R.C.A. (2008). Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 154, 142–147.
- Papini, R., Gorini, G., Spaziani, A. & Cardini, G. (2005). Survey on giardiasis in shelter dog populations. *Veterinary Parasitology*, 128, 333–339.
- Payne, P.A., Ridley, R.K., Dryden, M.W., Bathgate, C., Milliken, G.A. & Stewart, P.W. (2002). Efficacy of a combination febantel-praziquantel-pyrantel product, with or without vaccination with a commercial *Giardia* vaccine, for treatment of dogs with naturally occurring giardiasis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(3), 330–334.
- Pereira da Fonseca, I.M. (2000). *Contribuição para o estudo da criptosporidiose animal em Portugal: Caracterização genética de isolados de Cryptosporidium parvum de origem bovina*. Tese de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- Piva, B. & Benchimol, M. (2004). The median body of *Giardia lamblia*: An ultrastructural study. *Biology of the Cell*, 96, 735–746.
- Plutzer, J. & Karanis, P. (2009). Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary Parasitology*, 165, 187–199.
- Plutzer, J., Ongerth, J. & Karanis, P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213, 321–333.
- Prescott, L., Harley, J. & Klein, D. (2005). *Microbiology* (6th ed). New York, USA: Mc Graw Hill.
- Prucca, C.G. & Lujan, H.D. (2009). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cellular Microbiology*, 11(12), 1706–1715.
- Ramirez, N.E., Ward, L.A. & Sreevatsan, S. (2004). A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, 6, 773–785.
- Ramsey, I. (2008). *BSAVA Small Animal Formulary* (6th ed.). England: British Small Animal Veterinary Association.
- Ratner, D.M., Cui, J., Steffen, M., Moore, L.L., Robbins, P.W. & Samuelson, J. (2008). Changes in the N-glycome, glycoproteins with Asn-linked glycans, of *Giardia lamblia* with differentiation from trophozoites to cysts. *Eukaryotic Cell*, 7(11), 1930–1940.
- Riggio, F., Mannella, R., Ariti, G. & Perrucci, S. (2013). Intestinal and lung parasites in owned dogs and cats from central Italy. *Veterinary Parasitology*, 193, 78–84.

- Rimhanem-Finne, R., Enemark, H. L., Kolehmainen, J., Toropainen, P., & Hanninen, M. L. (2007). Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, 145, 345–348.
- Rishniw, M., Liotta, J., Bellosa, M., Bowman, D.D. & Simpson, K.W. (2010). Comparison of 4 *Giardia* diagnostic tests in diagnosis of naturally acquired canine chronic subclinical giardiasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, 293–297.
- Robertson, I.D., Irwin, P.J., Lymbery, A.J. & Thompson, R.C.A. (2000). The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30, 1369–1377.
- Roxström-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E. & Svärd, S.G. (2006). *Giardia* immunity: An update. *Trends in Parasitology*, 22, 26–31.
- Sagolla, M.S., Dawson, S.C., Mancuso, J.J. & Cande, W.Z. (2006). Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *Journal of Cell Science*, 119(23), 4889–4900.
- Santos, J. (2014). *Estudo observacional transversal de parasitas em cães errantes no concelho de Vila Franca de Xira, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (pp.38-100). Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.
- Savioli, L., Smith, H.V. & Thompson, R.C.A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. *Trends in Parasitology*, 22(5), 203–208.
- Scaramozzino, P., Cave, D., Berrilli, F., D’Orazi, C., Spaziani, A., Mazzanti, S., Scholl, F. & Liberato, C. (2009). A study of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting kennelled dogs. *Veterinary Journal*, 182, 231–234.
- Scorza, V. & Tangtrongsup, S. (2010). Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(3), 163–169.
- Serrano, S. (2011). *Avaliação da ocorrência de Giardia spp. por diferentes métodos coprológicos*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Silva, M. (2010). *Rastreo de parasitas gastrointestinais, pulmonares, cutâneos e musculares em canídeos domésticos e silvestres no norte de Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (pp.66-110). Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Smith, H.V, Nichols, R.A. & Grimason, A.M. (2005). *Cryptosporidium* excystation and invasion: Getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, 21(3), 133–142.
- Sprong, H., Cacciò, S. & Giessen, J. (2009). Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 3(12), 1-12. Acedido em Abr. 2,

2014, disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2777335&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Takumi, K., Swart, A., Mank, T., Lasek-Nesselquist, E., Lebbad, M., Cacciò, S.M. & Sprong, H. (2012). Population-based analyses of *Giardia duodenalis* is consistent with the clonal assemblage structure. *Parasites & Vectors*, 5, 1-7. Acedido em Abr. 2, 2014, disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3431248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tangtrongsup, S. & Scorza, V. (2010). Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp infections in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(3), 155–162.
- Templeton, T.J., Lancto, C.A., Vigdorovich, V., Liu, C., London, N.R., Hadsall, K.Z. & Abrahamsen, M.S. (2004). The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infection and Immunity*, 72(2), 980–987.
- Tetley, L., Brown, S.M., McDonald, V. & Coombs, G.H. (1998). Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology*, 144, 3249–3255.
- The Center for Food Security & Public Health. (2005). *Cryptosporidiosis*. *The Center for Food Security & Public Health*. Iowa: US. Acedido em Ago. 22, 2014, disponível em www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/cryptosporidiosis.pdf.
- The Center for Food Security & Public Health. (2012). Giardiasis. *The Center for Food Security & Public Health*. Iowa: US. Acedido em Ago. 22, 2014, disponível em www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/giardiasis.pdf.
- Thomaz, A., Meireles, M.V, Soares, R.M., Pena, H.F. & Gennari, S.M. (2007). Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 150, 291–296.
- Thompson, R.C.A. (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 126, 15–35.
- Thompson, R.C.A., Palmer, C.S. & O’Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 177, 18–25.
- Titilincu, A., Mircean, V., Achelaritei, D. & Cozma, V. (2010). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in asymptomatic dogs by ELISA and risk factors associated with infection. *Lucrări Științifice*, 43, 7–12.
- Traub, R. J., Monis, P. T., Robertson, I. D., Irwin, P., Mencke, N. & Thompson, R. C. A. (2004). Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology*, 128, 253–262.
- Tzipori, S. & Campbell, I. (1981). Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. *Journal of Clinical Microbiology*, 14(4), 455–456.

- Tzipori, S. & Ward, H. (2002). Cryptosporidiosis: Biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4(10), 1047–1058.
- Upjohn, M., Cobb, C., Monger, J., Geurden, T., Claerebout, E. & Fox, M. (2010). Prevalence, molecular typing and risk factor analysis for *Giardia duodenalis* infections in dogs in a central London rescue shelter. *Veterinary Parasitology*, 172(3-4), 341–346.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. & Jennings, F.W. (1996). *Parasitologia Veterinária* (2ª ed). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Valigurová, A., Jirků, M., Koudela, B., Gelnar, M., Modrý, D. & Slapeta, J. (2008). Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *International Journal for Parasitology*, 38, 913–922.
- Verweij, J.J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., van Rooyen, M., van Lieshout, L. & Polderman, A.M. (2003). Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Molecular and Cellular Probes*, 17, 223–225.
- Vohra, P., Sharma, M. & Chaudhary, U. (2012). A comprehensive review of diagnostic techniques for detection of *Cryptosporidium parvum* in stool samples. *Journal of Pharmacy*, 2(5), 15–26.
- World Health Organization. (2005). Preventing Travellers' Diarrhoea: How to Make Drinking Water Safe. *Sustainable Development and Healthy Environments Water, Sanitation and Health*, pp.1-7. Geneva, Switzerland: WHO.
- World Health Organization. (2006). *Cryptosporidium*. *WHO Guidelines for Drinking Water Quality*. pp.15-26. Geneva, Switzerland: WHO.
- Xiao, L., Cama, V., Cabrera, L., Ortega, Y., Pearson, J. & Gilman, R.H. (2007). Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 2014–2016.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L., Alves, J., Serrano, M., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A., Pearson, W., Dear, P., Bankier, A., Peterson, D., Abrahamsen, M., Kapur, V., Tzipori, S. & Buck, G. (2004). The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, 431, 1107–1112.
- Zaglool, D., Mohamed, A., Khodari, Y. & Farooq, M. (2013). Crypto-*Giardia* antigen rapid test versus conventional modified Ziehl-Neelsen acid fast staining method for diagnosis of cryptosporidiosis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 1, 212–215.
- Zanzani, S.A., Gazzonis, A.L., Scarpa, P., Berrilli, F. & Manfredi, M.T. (2014). Intestinal parasites of owned dogs and cats from metropolitan and micropolitan areas: Prevalence, zoonotic risks, and pet owner awareness in northern Italy. *BioMed Research International*, 2014, 1-11. Acedido em Jun. 13, 2014, disponível em <http://dx.doi.org/10.1155/2014/696508>.

ANEXO I. RESUMO DO PAINEL SUBMETIDO AO XVII CONGRESSO PORTUGUÊS DE PARASITOLOGIA

Prevalência de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. em Cães do Distrito de Bragança, Portugal

Sílvia Leal¹, Gonçalo Vicente², Álvaro Mendonça³, José Meireles⁴

¹Mestrado Integrado da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

²Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Av. Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal

³Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Campo Grande 50, 1700-093 Lisboa, Portugal

⁴Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Av. Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal

Introdução: Os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. infetam vários hospedeiros incluindo o Homem e são considerados importantes parasitas dos animais domésticos (Thompson, Palmer & O'Handley, 2008) e nos quais as infeções são geralmente assintomáticas ou autolimitantes (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites, 2011). No cão, estudos realizados em Portugal obtiveram prevalências de *Cryptosporidium* spp. entre 11% e 18% (Lebre, 2011; Santos, 2014) e de *Giardia* spp. entre 1,3% e 61% (Fernandes, 2012; Ferreira, 2011; Lebre, 2012; Santos, 2014), dependendo de vários fatores como a origem do cão e o teste de diagnóstico escolhido. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência destes parasitas em cães do distrito de Bragança, do qual se desconhecem estudos similares.

Material e Métodos: Neste estudo, 126 amostras fecais de cães de várias origens, idades, géneros e raças foram analisadas por imunofluorescência direta (Crypto/Giardia cel[®], Cellabs) para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de quistos de *Giardia* spp. , com.

Resultados: Das 126 amostras fecais analisadas, 27 (21,4%) apresentaram pelo menos um protozoário. Os quistos de *Giardia* spp. foram detetados em 25 amostras fecais (19,8%). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na prevalência de *Giardia* spp. entre cães machos (20,0%) e fêmeas (19,7%), nem entre cães de raça pura/cruzada (16,3%) e de raça indeterminada (21,8%). Houve uma maior prevalência significativa ($p<0,05$) de *Giardia* spp. em cães provenientes de canis públicos (26,5%) e em cães adultos com menos de 7 anos (26,7%). Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detetados em 3 amostras fecais (2,4%). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na prevalência de *Cryptosporidium* spp. entre cães machos (1,8%) e fêmeas (3,0%), entre cães de raça pura/cruzada (0%) e de raça indeterminada (3,8%), entre cães jovens (8,0%), adultos (1,3%) e idosos (0%) e entre cães oriundos de canis públicos (3,6%), de abrigos (0%) e de proprietários (0%).

Discussão e Conclusões: Os resultados deste estudo demonstraram que os cães do distrito de Bragança são importantes reservatórios do protozoário com carácter zoonótico, *Giardia* spp. A idade adulta (mais de um ano e menos de 7 anos) e a proveniência de canil público foram considerados fatores de risco para a infeção por *Giardia* spp. A prevalência de *Cryptosporidium* spp. nos cães do distrito de Bragança não parece ser relevante. A associação de ambos os protozoários também parece ser rara.

Referências bibliográficas:

- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. (2011). *Control of intestinal protozoa in dogs and cats. ESCCAP Guidelines 06 First Edition, 1-24. Worcestershire, UK: ESCCAP.*
- Fernandes, A. D. (2014). *Parasitismo por Giardia spp. em canis de criação na região de Viseu, Portugal.* Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Ferreira, F.S., Pereira-Baltasar, P., Parreira, R., Padre, L., Vilhena, M., Tavira, L.T., Atouguia, J. & Centeno-Lima, S. (2011). Intestinal parasites in dogs and cats from district of Évora, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 179, 242-245.
- Lebre, F.L. (2011). *Rastreio de parasitas gastrointestinais e seu impacto zoonótico em cães de canil da cidade de Lisboa.* Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Santos, J. P. (2014). *Estudo observacional transversal de parasitas em cães errantes no concelho de Vila Franca de Xira, Portugal.* Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Thompson, R. C. A., Palmer, C. S., & O'Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 177, 18–25.

ANEXO II. PAINEL SUBMETIDO AO XVII CONGRESSO PORTUGUÊS DE PARASITOLOGIA



Prevalência de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. em cães do distrito de Bragança, Portugal



Leal, S.¹, Vicente, G.², Mendonça, A.³, Meireles, J.¹

1. CISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Av. Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal
2. Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Av. Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal
3. Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Campo Grande 50, 1700-093 Lisboa, Portugal

PROJETO
0441_ZOONOSIS_2_E 0461_BIOURB_2_E_E

Introdução

Os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. infetam vários hospedeiros incluindo o homem; são considerados importantes parasitas dos animais domésticos, nos quais as infeções são geralmente assintomáticas ou autolimitantes (Thompson, Palmer & O'Handley, 2008). No cão, estudos realizados em Portugal obtiveram prevalências de *Cryptosporidium* spp. entre 11% e 18% (Lebre, 2011; Santos, 2014) e de *Giardia* spp. entre 1.3% e 61% (Fernandes, 2012; Ferreira, 2011; Lebre, 2012; Santos, 2014), dependendo de vários fatores como a origem do cão e o teste de diagnóstico escolhido.

Objetivos

1. Determinar a prevalência de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. em cães do distrito de Bragança;
2. Associação dos protozoários em foco a eventuais fatores de risco;
3. Consideração acerca da importância destes parasitas no cão enquanto animal de companhia e consequente exposição do homem aos mesmos.

Material e Métodos

Neste estudo, 126 amostras fecais de cães de uma amostra populacional variável foram analisadas por imunofluorescência direta (Crypto/Giardia Cel®, Cellabs) para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Fig. 1A) e de quistos de *Giardia* spp. (Fig. 1B).

Resultados

Das amostras fecais analisadas, 21.4% apresentaram pelo menos um protozoário.

A prevalência de *Giardia* spp. na amostra populacional foi de 19.8% (Gráfico n.º 1). Houve uma maior prevalência significativa ($p < 0.05$) de *Giardia* spp. em cães provenientes de canis intermunicipais (26.5%) e em cães adultos com menos de 7 anos (26.7%). A influência do género e da raça na presença da infeção não foi significativa.

A prevalência de *Cryptosporidium* spp. na amostra populacional foi de 2.4%. Nenhum dos fatores origem, género, raça e idade foi significativo na prevalência do parasita.

A infeção por ambos os protozoários foi detetada em uma amostra.

Figura n.º 1: Quisto de *Giardia* spp. (A) e oocisto de *Cryptosporidium* spp. (B).

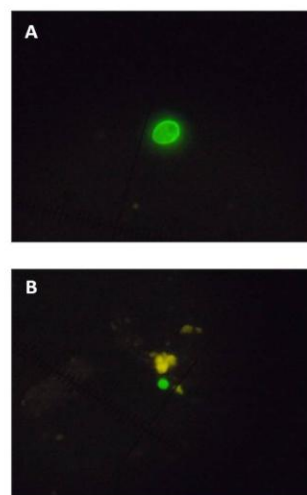


Gráfico n.º 1: Prevalências de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.



Discussão e Conclusões

Os resultados deste estudo demonstraram que os cães do distrito de Bragança são importantes reservatórios do protozoário com carácter zoonótico, *Giardia* spp. A idade adulta (mais de um ano e menos de 7 anos) e a proveniência de canil intermunicipal foram considerados fatores de risco para a infeção por *Giardia* spp. A prevalência de *Cryptosporidium* spp. nos cães neste distrito não parece ser relevante. A associação de ambos os protozoários também parece ser rara.

A exposição do homem, através do cão, ao protozoário *Giardia* spp. parece ser moderada neste distrito; a equipa técnica dos canis intermunicipais parece ser o grupo mais exposto.

Bibliografia

Fernandes, A. D. (2012). *Parasitismo por Giardia spp. em canis de criação na região de Viseu, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. Ferreira, F.S., Pereira-Baltazar, P., Pereira, R., Padra, L., Vilhena, M., Távira, L.T., Atouguia, J. & Centeno-Lima, S. (2011). Intestinal parasites in dogs and cats from district of Évora, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 175, 242-245. Lebre, F.L. (2011). *Rastreio de parasitos gastrointestinais e seu impacto zoonótico em cães de canil do distrito de Lisboa*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. Santos, J. P. (2014). *Estudo observacional transversal de parasitos em cães e gatos no canil de Vila Franca de Xira, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa. Thompson, R. C. A., Palmer, C. S., & O'Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 177, 18-25.

Financiamento: Projeto 0441_ZOONOSIS_2_E0461_BIOURB_2_E_E e Projeto FEAT-0E/AGR/AR0276/2014 (financiado pela FCT).

ANEXO III. ESPÉCIES DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP., ORGANIZADAS SEGUNDO AS CLASSES DE VERTEBRADOS (Adaptado de Chalmers & Katzer, 2013; Plutzer & Karanis, 2009)

	Espécie	Hospedeiros	
		Principais	Ocasionais
Mamíferos	<i>C. muris</i>	Roedores	Ungulados, primatas incluindo o Homem, cão, gato e mamíferos marinhos
	<i>C. andersoni</i>	Bovinos	Homem, outros ungulados incluindo ungulados selvagens e roedores
	<i>C. parvum</i> (antigos genótipo bovino, genótipo II e genótipo B de <i>C. parvum</i>)	Ruminantes e Homem	Cão, outros ungulados e roedores
	<i>C. hominis</i> (antigos genótipo humano, genótipo I e genótipo H de <i>C. parvum</i>)	Primatas incluindo o Homem	Roedores, ruminantes e mamíferos marinhos
	<i>C. canis</i> (antigo genótipo canino)	Canídeos	Homem e bovinos
	<i>C. felis</i>	Felídeos	Homem e bovinos
	<i>C. bovis</i> (antigo genótipo bovino B)	Bovinos	Caprinos
	<i>C. ryanae</i> (antigo genótipo <i>deer-like</i>)	Bovinos	-
	<i>C. suis</i> (antigo genótipo suíno I)	Suínos	Homem, bovinos
	<i>C. wrari</i>	Porquinho-da-índia	-
	<i>C. fayeri</i> (antigo genótipo marsupial I)	Marsupiais	-
	<i>C. macropodum</i> (antigo genótipo marsupial II)	Marsupiais	-
	<i>C. cuniculus</i> (antigo genótipo leporídeo)	Coelho, Homem	-
	<i>C. scrofarum</i> (antigo genótipo suíno II)	Suínos	Homem
	<i>C. tyzzeri</i> (antigo genótipo rato I)	Roedores	Homem
	<i>C. ubiquitium</i> (antigo genótipo cervino)	Caprinos	Homem, roedores e mamíferos selvagens
	<i>C. viatorum</i>	Homem	-
	<i>C. xiaoi</i> (antigos genótipo <i>C. bovis-like</i> e <i>C. bovis</i> das ovelhas)	Ovinos	Caprinos

ANEXO III (CONTINUAÇÃO). ESPÉCIES DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP., ORGANIZADAS SEGUNDO CLASSE DE VERTEBRADOS

	Espécie	Hospedeiros	
		Principais	Ocasionais
Aves	<i>C. meleagridis</i>	Perús	Outras aves, Homem, cão e roedores
	<i>C. baileyi</i>	Galináceos	Outras aves
	<i>C. galli</i> (= <i>C. blagburni</i>)	Galinhas	Outras aves
Répteis	<i>C. varanii</i> (= <i>C. saurophilum</i>)	Cobras e lagartos	Outros répteis
	<i>C. serpentis</i>	Cobras e lagartos	Outros répteis
Anfíbios	<i>C. fragile</i>	Sapo asiático	-
	<i>C. molnari</i>	Pargo Dourado e Robalo Europeu	-
Peixes	<i>C. scophthalmi</i>	Rodvalho	-

ANEXO IV. FICHA DE IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS FECAIS



União Europeia
Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional
Investimos no seu futuro



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA
Escola Superior de Educação

Ficha de identificação

Código amostra _____

Concelho _____

Localidade _____

Responsável pela colheita _____

Local de recolha _____

Nº identificação do animal (chip) _____

Raça _____

Idade _____

Sexo _____

Porte _____

Peso _____

Condição corporal _____

Doenças diagnosticadas

Observações

Nome do proprietário/ instituição de acolhimento

ANEXO V. EFEITO DA ORIGEM, DA RAÇA, DO GRUPO ETÁRIO E DO GÊNERO NA PREVALÊNCIA DE HELMINTES

Fator	N.º total de amostras	N.º de amostras positivas	Prevalência % (IC 95%)	Associação estatística
Origem				
Canil de abrigo	13	10	76,9 (48,0-93,4)	<i>p</i><0,05
Canil intermunicipal	83	23	27,7 (19,0-38,5)	
Privado	24	0	0	
Raça				
Indeterminada	97	29	29,9 (21,6-39,7)	<i>p</i> >0,05
Pura	23	4	17,4 (6,2-38,9)	
Grupo etário				
≤ 1 ano	25	6	24,0 (11,0-43,9)	<i>p</i> >0,05
1 – 7 anos	74	18	28,1 (18,2-40,6)	
≥ 7 anos	15	5	33,3 (14,2-60,3)	
Género				
Feminino	65	24	36,9 (26,0-49,2)	<i>p</i><0,05
Masculino	55	9	16,4 (8,6-28,9)	